

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Burkhard Göke

**Effekte von Metformin auf humane neuroendokrine Tumorzellen in vitro –
Untersuchungen zu Metformin als antiproliferativ wirksame Substanz**

Dissertation
Zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig– Maximilians– Universität zu München

vorgelegt von
Ayse Tanyeri
aus München

2015

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: PD Dr. med. Christoph Auernhammer

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Felix Beuschlein

PD Dr. Stefan Böck

Mitbetreuung durch den

promovierten Mitarbeiter: Dr. rer. nat. Kathrin Zitzmann

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 21.05.2015

Eidesstattliche Versicherung

Ayse Tanyeri

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**Effekte von Metformin auf humane neuroendokrine Tumorzellen in vitro –
Untersuchungen zu Metformin als antiproliferativ wirksame Substanz**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 21.05.2015

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand

	Seite
I. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	- 4 -
1. EINLEITUNG.....	- 6 -
1.1. DEFINITION VON NEUROENDOKRINEN TUMOREN	- 6 -
1.2. EPIDEMIOLOGIE UND ÄTIOLOGIE.....	- 6 -
1.3. KLASSIFIKATION UND STADIENEINTEILUNG	- 7 -
1.4. PROGNOSEFAKTOREN	- 9 -
1.5. KLINISCHE SYMPTOMATIK	- 10 -
1.6. THERAPIE.....	- 12 -
1.6.1 CHIRURGISCHE THERAPIE.....	- 12 -
1.6.2 KONSERVATIVE THERAPIE	- 13 -
1.7. METFORMIN.....	- 14 -
1.7.1 METFORMIN ALS ANTIDIABETIKUM.....	- 14 -
1.7.2 WIRKUNG VON METFORMIN IN DER TUMORTHERAPIE.....	- 15 -
1.7.2.1 BISHERIGE STUDIEN ZU METFORMIN IN DER TUMORTHERAPIE.....	- 15 -
1.7.2.2 WIRKUNGSWEISE VON METFORMIN	- 18 -
2. ZIELSETZUNG DER VORLIEGENDEN ARBEIT.....	- 20 -
3. MATERIAL UND METHODEN	- 21 -
3.1. MATERIAL.....	- 21 -
3.2. METHODEN	- 26 -
4. ERGEBNISSE	- 34 -
4.1. METFORMIN INHIBIERT DIE LEBENSFÄHIGKEIT UND VERMINDERT DIE ZELLZAHL ..	- 34 -
4.2. EFFEKTE VON METFORMIN AUF DIE AMPK-PHOSPHORYLIERUNG.....	- 39 -
4.3. EFFEKTE VON METFORMIN AUF DEN PI3K/AKT/MTOR-SIGNALWEG	- 41 -
4.4. EFFEKTE VON METFORMIN AUF DIE GSK3 UND ERK	- 48 -
4.5. EFFEKTE VON METFORMIN AUF DIE APOPTOSE	- 50 -
4.6. EFFEKTE VON METFORMIN AUF DIE ZELLZYKLUSVERTEILUNG	- 52 -
5. DISKUSSION	- 56 -
6. ZUSAMMENFASSUNG	- 65 -
7. LITERATURVERZEICHNIS	- 67 -
8. PUBLIKATIONEN	- 75 -
8.1. ORIGINALPUBLIKATIONEN	- 75 -
8.2. KONGRESSBEITRÄGE.....	- 75 -
9. DANKSAGUNG	- 76 -

I. Abkürzungsverzeichnis

ACTH	<i>Adrenocorticotropes Hormon</i>
ADP	<i>Adenosindiphosphat</i>
AKT	<i>Proteinkinase B</i>
AMPK	<i>AMP-aktivierte Proteinkinase</i>
APUDom	<i>amine precursor uptake and decarboxylation</i>
ATP	<i>Adenosintriphosphat</i>
BMI	<i>Body-Mass-Index</i>
CgA	<i>Chromogranin A</i>
CO ₂	<i>Kohlenstoffdioxid</i>
CT	<i>Computertomographie</i>
DM	<i>Diabetes mellitus</i>
DMEM/F12	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12</i>
DMSO	<i>Dimethylsulfoxid</i>
4ebp1	<i>4E-bindendes Protein</i>
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
ENETS	<i>European Neuroendocrine Tumor Society</i>
ERK	<i>Extracellular-signal Regulated Kinase</i>
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FKS	<i>Fetales Kälberserum</i>
G 1-3	<i>engl. "gap"-Phase der Mitose</i>
GEP	<i>Grading 1-3</i>
GLUT	<i>Glukosetransporter</i>
G-Phase	<i>engl. "gap"-Phase der Mitose</i>
GRH	<i>Growth hormone</i>
GSK3	<i>Glykogensynthase-Kinase 3</i>
5-HIES	<i>5-Hydroxy-Indolessigsäure</i>
HPF	<i>high-power field</i>
IGF	<i>Insulin-like growth factor</i>
IGFR	<i>Insulin-like growth factor-Rezeptor</i>
INF- α	<i>Interferon-alpha</i>
IR	<i>Insulinrezeptor</i>
LAR	<i>long-acting release</i>
LKB1	<i>liver kinase B1</i>
LOH	<i>Loss of heterozygosity</i>
MAP	<i>Mitogen-activated protein</i>
MEK	<i>MAP/ERK Kinase</i>
MEN1	<i>Multiple Endokrine Neoplasie 1</i>
MgSO ₄	<i>Magnesiumsulfat</i>
MIB-1	<i>Molecular Immunology Borstel</i>
mM	<i>Millimolar</i>
MRT	<i>Magnetresonanztomographie</i>
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
NEC	<i>neuroendokrines Karzinom</i>
NEN	<i>neuroendokrine Neoplasie</i>
NET	<i>neuroendocrine carcinoma</i>
OCT	<i>organischer Kationentransporter</i>
PARP	<i>Poly (-ADP-ribose-) polymerase</i>

I. Abkürzungsverzeichnis

PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PDGF	<i>Platelet Derived Growth Factor</i>
PET	<i>Positronen Emissions Tomographie</i>
PFS	<i>progression-free survival</i>
PVDF	<i>Polyvinylidenfluorid</i>
RFA	<i>Radiofrequenzablation</i>
SDS	<i>Sodium dodecylsulfate polyacrylamide</i>
SIRT	<i>selektive intraarterielle Radiotherapie</i>
SPECT	<i>Single Photon Emission Computed Tomographie</i>
S-Phase	<i>Synthesephase der Mitose</i>
SRS	<i>Somatostatinrezeptorszintigraphie</i>
SSA	<i>Somatostatinanaloga</i>
SSR	<i>Somatostationrezeptor</i>
TAE	<i>Transarterielle Embolisation</i>
TACE	<i>Transarterielle Chemoembolisation</i>
TBS-T	<i>Tris-Buffered Saline and Tween 20</i>
TNM-Stadien	<i>Tumor, Lymphknoten, Metastasen-abhängige Tumorstadien</i>
TSC	<i>tuberous sclerosis complex</i>
UICC	<i>Union internationale contre le cancer</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VHL	<i>Von-Hippel-Lindau</i>
VIP	<i>vasoaktive Intestinalpeptid</i>
WDHA	<i>Water Diarrhea Hypokalemia Achlorhydria</i>
WHO	<i>World Health Organisation</i>

1. Einleitung

1.1. Definition von neuroendokrinen Tumoren

Neuroendokrine Neoplasien bilden bezüglich ihrer Biologie und Klinik eine sehr heterogene Gruppe von Tumoren [1]. Die Bezeichnung Karzinoid wurde 1907 von Obendorfer für neuroendokrine Neoplasien eingeführt, um sie von aggressiven Adenokarzinomen zu unterscheiden. Heute bezieht sich der Terminus Karzinoid nur auf neuroendokrine G1 Tumore, gemäß der WHO Klassifikation 2010 [2]; im angelsächsischen Sprachraum werden als Karzinoide neuroendokrine Tumoren des Dünndarms bezeichnet, außerdem werden im Bereich des Bronchialsystems typische und atypische Karzinoide der Lunge unterschieden [3]. Neuroendokrine Pankreastumore werden dagegen nicht als Karzinoide bezeichnet; im angelsächsischen Sprachraum ist dagegen entsprechend der Tumorabstammung aus den Langerhans-Zellen der Begriff „islet cell tumor“ gebräuchlich [4]. Der Ausdruck neuroendokriner Tumor symbolisiert die Abstammung des Tumors aus neuroendokrinen Zellen des Gastrointestinaltrakts, welche sich aus der embryonalen Neuralleiste entwickeln. Die Abkürzung APUDom („amine precursor uptake and decarboxylation“), welche 1996 von Pearse eingeführt wurde, bezeichnet dabei die Fähigkeit dieser Tumore biogene Amine zu produzieren und zu sezernieren [4, 5].

1.2. Epidemiologie und Ätiologie

Neuroendokrine Tumoren sind mit einem Anteil von 0,5-2 % bezogen auf alle Neoplasien relativ selten [6]. Die Inzidenz ist dabei bei Männern etwas höher und liegt bei 3,3/100000 im Vergleich zu 2,6/100000 Einwohner pro Jahr bei Frauen. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei etwa 62 Jahren [7]. Zu etwa 75 % - und damit am häufigsten-; befinden sich die NEN im gastroenteropankreatischen System und in etwa 20 % im bronchopulmonalen System [8]. Es kann bei GEP-Tumoren zwischen sporadisch und im Rahmen eines hereditären Tumorsyndroms

auftretenden Tumoren unterschieden werden [4]. Die genetische Grundlage ist dabei, bis auf hereditäre GEP-Tumoren, weitgehend unbekannt. Es scheint jedoch genetische Unterschiede, abhängig von der Hormonproduktion und Tumorlokalisation, zu geben [7]. Zu den hereditären Tumorsyndromen, im Rahmen welcher GEP-Tumore auftreten können, zählen die multiple endokrine Neoplasie Typ1 (MEN1), das von-Hippel-Lindau(VHL)-Syndrom, die Tuberöse Sklerose und die Neurofibromatose Typ 1 von Recklinghausen [9]. MEN1 ist eine autosomal-dominant vererbte Erkrankung, welcher eine Keimbahnmutation im Tumorsupressorgen MEN1 zugrunde liegt. Der Ausfall des zweiten Gens im Rahmen einer somatischen Deletion, was als Verlust der Heterozygotie (engl. loss of heterocytosity, kurz LOH) bezeichnet wird, führt letztlich zur Entstehung von NET. Menin, das Genprodukt von MEN1, interagiert mit transkriptionellen Regulationsproteinen. Im Rahmen von MEN1 treten syn- oder methachrone Tumoren der Nebenschilddrüse, der Hypophyse, neuroendokrine Tumoren des Pankreas sowie selten Karzinoide der Lunge und des Thymus auf [4, 6, 7]. NET mit Somatostatinproduktion im Bereich der Papille sind in 30 % der Fälle mit der Neurofibromatose Typ 1 assoziiert [7]. In bis zu 12 % weisen Patienten mit einem VHL-Syndrom NET des Pankreas auf [4].

1.3. Klassifikation und Stadieneinteilung

Nach Williams und Sandler (1963) wurden NET nach ihrer Lokalisation eingeteilt in „Foregut“-/ Vorderdarm- (Lunge, Bronchien, Speiseröhre bis Zwölffingerdarm und Pankreas), „Midgut“-/ Mitteldarm- (Jejunum bis proximale 2/3 des Kolon transversum) und „Hindgut“-/ Hinterdarmtumore (restliches Kolon bis einschließlich Rektum) [5, 10]. Die WHO-Klassifikation für neuroendokrine Neoplasien (NEN) hat sich im Laufe der Zeit immer weiter verändert (siehe Tabelle 1). Die derzeit gültige WHO-Klassifikation aus dem Jahre 2010 geht davon aus, dass alle NEN potenziell maligne sind und unterscheidet im ersten Schritt zwischen gut differenzierten neuroendokrinen Tumoren (NET) und schlecht differenzierten neuroendokrinen Karzinomen (NEC) [7]. Zur histologischen Klassifikation eines Tumors als eine NEN steht der immunhistochemische Nachweis von Synaptophysin und Chromogranin

zur Verfügung [5, 7]. Synaptophysin ist in jedem NET nachweisbar, da es Bestandteil der synaptischen, kleinen Vesikeln ist, welche unabhängig vom Hormongehalt in jedem NET zu finden sind. Die Sensitivität von Chromogranin A beträgt mehr als 90 %, jedoch ist CgA als Bestandteil der hormonenthaltenden großen Vesikeln nicht immer bzw. zum Teil nur in geringer Menge nachweisbar. Somit ist der Nachweis von Chromogranin A abhängig von der Hormonspeicherung des Tumors [7, 11]. Als nächster Schritt in der WHO-Klassifikation wird das Grading, auf Basis der Proliferationsaktivität, bestimmt. Hierzu sollte die Anzahl der Mitosen auf 10 HPF (=2 mm²) und immunhistochemisch der MIB-1/Ki-67 Proliferationsindex in % ermittelt werden. Beim Grading werden 3 Gruppen unterschieden, G1 mit <2 % proliferativer Aktivität, G2 mit 3-20 % und G3 mit >20 % proliferativer Aktivität [11]. NET G1 können alternativ mit dem historischen Begriff Karzinoid benannt werden [7]. Typischerweise werden somit NET G1 und NET G2 von den NEC G3 unterschieden; selten kann auch die Entität NET G3 vorkommen [7]. Das Staging von NET erfolgt durch eine, von der Primärlokalisation abhängige, spezifische TNM-Klassifikation und Stadieneinteilung [7]. Dabei folgte die UICC-Klassifikation von 2009 zum größten Teil der European Neuroendocrine Tumor Society (ENETS)–Klassifikation von 2006/2007, jedoch sind einige Unterschiede zwischen beiden Klassifikationen bei neuroendokrinen Appendix- und Pankreastumoren gegeben [11]. Bei diesen Lokalisationen kann es dann vorteilhaft sein beide Klassifikationen zu verwenden [11]

WHO-Klassifikationen von GEP-NEN im Verlauf		
WHO 1980	WHO 2000	WHO 2010
Karzinoid	hoch differenzierter neuroendokriner Tumor	Neuroendokriner Tumor G1 (Karzinoid)/ <2 % proliferative Aktivität G2/ 2-20 % proliferative Aktivität
	hoch differenziertes neuroendokrines Karzinom	
	gering differenziertes (kleinzelliges) neuroendokrines Karzinom	(klein-/großzelliges) neuroendokrines Karzinom G3/ >20 % proliferative Aktivität
Mukokarzinoid Gemischtes Karzinoid-Adenokarzinom	gemischtes endokrinexokrines Karzinom	gemischtes adeno-neuroendokrines Karzinom
pseudotumöröse Läsion	Tumor-ähnliche Läsion	hyperplastische und präneoplastische Läsion

Tabelle 1 angelehnt an [7, 11]

1.4. Prognosefaktoren

Die Prognose eines NET ist von verschiedenen Gegebenheiten abhängig. Dazu zählen die Lokalisation des Primarius, das Grading inkl. dem Proliferationsindex Ki-67, das TNM-Stadium mit regionalen Tumorstadien, lokoregionäre Lymphknotenmetastasen oder Fernmetastasen, die Höhe der Tumormarkierung bei vorliegender Lebermetastasierung und die Höhe des Tumormarkers Chromogranin A sowie die Funktionalität der Tumoren [5, 7].

1.5. Klinische Symptomatik

Es werden funktionell aktive und funktionell inaktive NET unterschieden [7]. Funktionell aktiv bedeutet, dass die Tumorsekretionsprodukte ein Hypersekretionssyndrom verursachen [5]. Zu diesen hormonellen Syndromen zählen z.B. das Zollinger-Ellison-Syndrom beim Gastrinom und das Karzinoidsyndrom im Rahmen eines NET des Dünndarms mit Leberfiliae. Die funktionell aktiven Tumore werden dabei nach ihrem Sekretionsprodukt bezeichnet. So können z.B. bei NE-Pankreastumoren das Insulinom, Gastrinom, Glukagonom, VIPom usw. unterschieden werden [7]. Die unterschiedlichen Symptome, die im Rahmen der verschiedenen Hypersekretionssyndrome auftreten können, sind in Tabelle 2 dargestellt. Symptome, durch welche vor allem auch funktionell inaktive NET auffällig werden, sind Beschwerden aufgrund einer lokalen Verdrängung mit abdominellen Schmerzen und/oder Ileussyptomatik, wobei die abdominellen Schmerzen teilweise auch durch eine desmoplastische Reaktion des Mesenteriums bedingt sein können [7]. Die desmoplastische Reaktion entsteht vermutlich durch Tumorprodukte, welche autokrin freigesetzt werden und zu einer Raffung des Mesenteriums führen [6, 7]. Diese Raffung des Mesenteriums ist auch in der Schnittbilddiagnostik nachweisbar und führt oft zu verkannten Bauchschmerzen bis hin zur Ischämie der Darmwand [6].

1. Einleitung

Tumor	Sekretionsprodukt	Klinik
ACTHom	ACTH↑	- Cushing-Syndrom
Insulinom	Insulin↑	- Whipple-Trias: neuroglukopenische Symptome (Diplopie, Verwirrtheit, Aggressivität, Konvulsionen und Bewusstlosigkeit), gleichzeitiger Nachweis einer Hypoglykämie <40mg/dl und Besserung der klinischen Symptomatik nach Glukosegabe - adrenerge Symptome (Tachykardie, Angst, Schwitzen und Palpitationen)
Gastrinom	Gastrin↑	- Rezidivierende peptische Ulzera, sekretorische Diarrhöen, Maldigestion
Glukagonom	Glukagon↑	- Diabetes mellitus, nekrolytisches migratorisches Erythem, Anämie
GRHom	Growth Hormone Releasing Hormone↑	- Akromegalie, gestörte Glukosetoleranz
Karzinoidsyndrom	↑: Serotonin, Kinine, Kallikrinin, Prostaglandine	- Flush (60-85 %), sekretorische Diarrhöen (60-80 %), Endokardfibrose des rechten Vorhofs und Ventrikels, Bronchokonstriktion (<10 %)
Somatostatinom	Somatostatin↑	- Steatorrhöen, Diarrhöen, Cholelithiasis, Diabetes mellitus
VIPom	Vasoaktives intestinales Polypeptid↑	- WDHA= Wässrige Diarrhö, Hypokaliämie, Achlorhydrie

Tabelle 2 angelehnt an [5, 12]

1.6. Therapie

Therapieziele bei NET sind die chirurgische Entfernung des Tumors in kurativer Absicht sowie in palliativer Situation die Hemmung des Tumorwachstums und die Kontrolle der durch ein Hypersekretionssyndrom bedingten Symptome [4].

1.6.1 Chirurgische Therapie

Die chirurgische Resektion von NET ist derzeit die einzige kurative Therapie [5]. Hierbei unterscheidet sich das Vorgehen abhängig von der Lokalisation des Tumors, der lokalen Ausbreitung und der Fernmetastasierung [7]. Für das diagnostische und therapeutische Vorgehen wurden von der European Neuroendocrine Tumor Society (ENETS) Guidelines herausgegeben [13]. Ein operatives Debulking bei Lebermetastasen ist indiziert, wenn hierdurch 90 % der Tumormasse reseziert werden kann [4]. Hierdurch kann die Prognose verbessert werden. Weitere Möglichkeiten zur Behandlung von Lebermetastasen sind lokoregionäre ablativ Verfahren, wie z.B. die Radiofrequenzablation (RFA), die transarterielle Embolisation (TAE) oder transarterielle Chemoembolisation (TACE) sowie die selektive intraarterielle Radiotherapie (SIRT) [4, 7, 11]. Der Hintergrund für die Wirksamkeit von lokoregionalen ablativen Verfahren ist, dass Lebermetastasen von NET stark vaskularisiert sind und die Blutversorgung fast ausschließlich über die A. hepatica erfolgt [4].

1.6.2 Konservative Therapie

Als konservative, nicht operative Therapie stellt die medikamentöse Therapie eine wichtige Option dar. Dabei können verschiedene Ansätze unterschieden werden, die Biotherapie mit Somatostatinanaloga und Interferon- α , die Chemotherapie, eine symptomatische Therapie bei Hypersekretionssyndromen und die molekular zielgerichtete Therapie [7, 14]. Zur Biotherapie werden langwirksame Somatostatinanaloga, wie „long-acting release“ (LAR-) Octreotid und Lanreotid-Autogel mit einer mittleren Wirkungsdauer von 28 Tagen eingesetzt. Sie binden v.a. an den SSTR-2 und -5 und bewirken bei 70% der Patienten mit einem Karzinoidsyndrom eine Symptomverbesserung. Da SSA auch zur Verlängerung der Tumorprogression führen [15], empfehlen die aktuellen ENETS-Leitlinien eine Therapie mit Somatostatinanaloga auch bei funktionell inaktiven NET des Jejunums/Ileums [7]. Als Add-on-Therapie kann bei unzureichender Symptomkontrolle Interferon- α hinzugegeben werden, was jedoch aufgrund des Nebenwirkungsprofils nur eine Second-line-Therapieoption darstellt. Bezogen auf die antiproliferative Wirkung zeigte die Kombinationstherapie aus SSA und INF- α keinen signifikanten Unterschied zur jeweiligen Monotherapie [14]. Eine systemische Chemotherapie wird erst bei einem Tumorprogress und Versagen anderer Therapieoptionen eingesetzt. Abhängig von der Tumorlokalisation und dem Nebenwirkungsprofil werden unterschiedliche Chemotherapeutika eingesetzt [7]. Für inoperable NET des Pankreas existiert ein etablierter Therapieansatz mit Streptozotocin-basierten Chemotherapieschemata [14]. Dagegen werden NET des Jejunums und Ileums als relativ chemosensitiv angesehen [14]. Bei NEC des GEP-Systems wird die Kombination aus Cisplatin und Etoposid in den ENETS-Leitlinien empfohlen [14]. Als antiproliferative molekulare zielgerichtete Therapie sind, für die Behandlung von inoperablen oder metastasierten NET G1/G2 des Pankreas mit Progression, Everolimus und Sunitinib zugelassen. Everolimus ist ein Mammalian-target-of-rapamycin (mTOR)-Inhibitor, welcher den Phosphatidylinositol (PI)-3-Kinase-AKT-mTOR-Signalweg hemmt. Dabei verbessert Everolimus das progressionsfreie Überleben (PFS) und führt zur Tumorstabilisierung, ebenso wie Sunitinib. Sunitinib ist ein Multityrosinkinasehemmer, welcher den „vascular

endothelial growth factor receptor“ (VEGFR) 1-3 und „platelet-derived growth factor receptor“ (PDGFR) hemmt und damit die Entstehung von Wachstums- und Angiogenesefaktoren [7, 14].

1.7. Metformin

1.7.1 Metformin als Antidiabetikum

Metformin zählt zu der Gruppe der Biguanide und hat im Jahre 1958 in Großbritannien die Zulassung für die Behandlung von Hyperglykämien erhalten [16, 17]. Die Biguanide, zu welchen auch Phenformin and Buformin zählen, wurden aus Inhaltsstoffen des Krautes *Galega officinalis* abgeleitet und zur Behandlung des Diabetes mellitus Typ 2 verwendet [18, 19]. Das Problem an Phenformin und Buformin lag in ihrer Toxizität durch das Auftreten von Laktatazidosen, weshalb sie vom Markt genommen wurden [17]. Heutzutage zählt Metformin zu den meist genutzten oralen glukosesenkenden Medikamenten und wird, wenn keine Kontraindikationen bestehen, von der American Diabetes Association und der European Association für die Behandlung eines Diabetes mellitus Typ 2 empfohlen [16, 20]. Es ist ein sehr sicheres Arzneimittel mit sehr geringen Kosten [17]. Metformin wirkt durch die Senkung des Nüchternblutzuckers, hauptsächlich durch Verminderung der Glukoneogenese und durch Erhöhung der Sensitivität der Muskulatur gegenüber Insulin durch erhöhte Expression von GLUT4 [21, 22]. Zusätzlich führt Metformin, im Gegensatz zu z.B. Sulfonylharnstoffen, zu keiner Gewichtszunahme, Hypoglykämie oder zu erhöhten Insulinkonzentrationen [16].

Zu den typischen Nebenwirkungen von Metformin zählen gastrointestinale Beschwerden, wie zum Beispiel Appetitlosigkeit, abdominelle Schmerzen, Geschmacksstörungen, Übelkeit und Diarrhoe. Seltener können auch Müdigkeit und ein B12-/Folsäuremangel auftreten. Eine sehr seltene, aber überaus gefährliche, unerwünschte Wirkung von Metformin ist die Laktatazidose. Kontraindikationen für eine Metformingabe sind eine Niereninsuffizienz, eine hochgradig eingeschränkte kardiopulmonale Situation und azidotische Stoffwechsellagen [22].

1.7.2 Wirkung von Metformin in der Tumorthherapie

1.7.2.1 Bisherige Studien zu Metformin in der Tumorthherapie

Der erste Bericht von Evans et al. [23], dass Metformin möglicherweise bei Typ-2 Diabetikern mit einem reduziertem Risiko für Tumorerkrankungen assoziiert ist, wurde in einer größeren epidemiologischen Kohortenstudie durch Libby et al. bestätigt [24]. Dabei wurden bei 7,3 % der 4.085 Metformin-Nutzer Tumore diagnostiziert, im Vergleich zu 11,6 % der 4.085 der Vergleichsgruppe, mit einer mittleren Zeit bis zum Auftreten des Tumors von je 3,5 und 2,6 Jahren ($p < 0,001$). Nach Anpassung des Geschlechts, Alters, BMI, HbA1c, Rauchen und Konsums anderer Medikamente, bestand weiterhin ein signifikant reduziertes Risiko für Tumore unter Metformintherapie [24].

In der „Zwolle Outpatient Diabetes project Integrating Available“ (ZODIAC)-Studie betrug die standardisierte Krebssterblichkeit 0,88 für Patienten unter Metformintherapie und 1,625 für Patienten, die kein Metformin erhielten (mediane Follow-up: 10 Jahre); dieser Unterschied änderte sich auch nicht nach Adjustierung der Störfaktoren [25].

Eine Konferenz im Dezember 2009 führte zu dem Konsensbericht, der eindeutig aufzeigt, dass es eine Verbindung zwischen einem Diabetes mellitus und dem Auftreten von Tumorerkrankungen bei Patienten gibt [26]. Bei Diabetes mellitus Patienten ist das relative Risiko für Karzinome des Kolons (26-%ige Zunahme der Inzidenz [17]), Endometriums (summary relative risk = SRR: 2.10, 95%-CI: 1.75-2.53 [27]), Rektums, der Brust (in prospektiven 23 %, in retrospektiven Studien 36 % erhöhtes Risiko [17]) und des Pankreas (SRR: 1.94, 95%-CI: 1.66–2.27 [28]) erhöht, während ein DM mit einem geringeren Risiko für Prostatakarzinome assoziiert ist [29].

Interessanterweise zeigte eine große prospektive Studie in Taiwan, dass die Inzidenz für gastroenterologische Tumore bei Diabetikern erhöht ist, aber eine Therapie mit Metformin (≤ 500 mg/Tag) das Auftreten von Tumoren nahezu oder sogar unter die beobachtete Inzidenz von nicht-diabetischen Patienten anglich [30].

Außerdem berichtete eine epidemiologische Studie, mit 2.529 an Brustkrebs erkrankten Frauen, über eine höhere komplette pathologische Remissionsrate (pCRs, als Surrogat für das Gesamtüberleben in diesem Rahmen) auf eine neoadjuvante systemische Therapie bei Diabetes-Patientinnen, welche mit Metformin behandelt wurden (pCR 24 %), im Vergleich zu Patientinnen mit einem Diabetes melitus, die kein Metformin erhielten (pCR 8 %) und nicht-diabetischen Patientinnen ohne Metformin (pCR 16 %). Doch trotz der Zunahme des pCR, verbesserte Metformin in dieser Studie nicht signifikant die geschätzte 3-Jahres-rezidivfreie Überlebensrate [31].

In Zellkulturversuchen konnte eine hemmende Wirkung von Metformin zum Beispiel auf ösophageale Tumorzellen [32], Brustkrebszellen[33] und Melanomtumorzellen [34] nachgewiesen werden.

In einer präklinischen Studien führte Metformin zu einem 72-prozentigen Rückgang der Tumorlast eines Tabak-induzierten Karzinoms in Mäusen [35].

Im Jahre 2001 induzierten Schneider M.B. et al. in einem Hamster-Modell mittels chemischen Karzinogenen und einer fettreichen Diät Pankreastumore. Diese wurden vollständig verhindert durch die Zugabe von Metformin in das Trinkwasser, wohingegen 50 % der Kontrolltiere ohne Metformin-Exposition Tumore entwickelten [36].

Eine klinische Kurzzeitstudie zeigte, dass Metformin in niedriger Dosierung von 250mg/d über einen Monat die Anzahl und Größe von kolorektalen abberanten Kryptenherden, einem endoskopischen Marker für kolorektale Karzinome, bei Patienten ohne Diabetes senkt [37].

Hadad et al. führten eine Pilotstudie mit einer geringen Patientenanzahl mit Brustkrebs durch. In dieser päroperativen Studie fiel der Prozentsatz an Zellen welche mit Ki-67 , einem prädiktiven Marker für die klinische oder pathologische Ansprechrate in der neoadadjuvanten Situation, anfärbbar waren, nach 2 Wochen Metformintherapie parallel zu positiven Auswirkungen auf die Gene des Zellzykluss [38].

1. Einleitung

Weiterhin konnte eine verbesserte Ansprechrate von Tumorzellen auf diverse Chemotherapeutiker bei einer Kombination mit Metformin nachgewiesen werden [39, 40], jedoch auch eine Verminderung der Ansprechrate [41].

Es existieren zudem laufende Phase 3 Studien mit Metformin in der Tumorthherapie, wie in Tabelle 3 zu sehen ist. Die Suche wurde über clinicaltrials.gov [42] durchgeführt.

Condition	Intervention	ClinicalTrials.gov Identifier
<i>Endometrial Cancer</i> Chemoprevention Study of Metformin	Drug: Metformin Other: Placebo Procedure: Endometrial Biopsy Behavioral: Lifestyle Intervention Behavioral: Questionnaires	NCT01697566
Stage III, IV, or Recurrent <i>Endometrial Cancer</i>	Paclitaxel and Carboplatin With or Without Metformin Hydrochloride	NCT02065687
Randomized Trial of Metformin vs Placebo in Early Stage <i>Breast Cancer</i>	Drug: metformin hydrochloride Other: placebo	NCT01101438
Atypical Hyperplasia or In Situ <i>Breast Cancer</i>	Drug: metformin hydrochloride Other: placebo	NCT01905046
<i>Prostate Cancer</i>	Drug: Metformin Drug: Placebo	NCT01864096
Metformin for Brain Repair in Children With Cranial-Spinal Radiation for <i>Medulloblastoma</i>	Drug: Metformin Drug: Placebo	NCT02040376

Tabelle 3 Phase 3 Studien zu Metformin stand 27.04.2014; suche auf [ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov) [42] unter „metformin cancer“

1.7.2.2 Wirkungsweise von Metformin

Die antitumorale Wirkung von Metformin ist assoziiert mit einem direkten (insulinunabhängigen) und einem indirekten (insulinabhängigen) Effekt (siehe Abbildung 1 und Abbildung 2). Die indirekte Wirkung ist bedingt durch die Fähigkeit von AMPK, welches durch Metformin aktiviert wird, die Transkription von Schlüsselgenen der Glukoneogenese in der Leber zu hemmen.

Zusätzlich fördert Metformin die Glukoseaufnahme in die Muskulatur und reduziert so den Nüchternblutzucker und den Insulinspiegel. Hyperglykämien führen zu erhöhten Insulinspiegeln. Insulin ist ein potenter Wachstumsfaktor und kann die Zellproliferation und Karzinogenese direkt und/oder durch den insulin-like growth factor 1 (IGF-1) fördern [43], was somit durch Metformin verhindert wird. Zudem führt eine Hyperinsulinämie zu einer Erhöhung der Bioaktivität von IGF-1 durch Hemmung des IGF-1-Bindungsproteins [43].

Der direkte, insulinunabhängige Grundmechanismus von Metformin ist bedingt durch die LKB1-vermittelte Aktivierung von AMPK und der damit verbundenen Hemmung des mTOR-Signalwegs und der Proteinsynthese in Tumorzellen [18]. AMPK wirkt auf mTOR über die Phosphorylierung und Aktivierung des Tumorsuppressorgens Tuberöse Sklerose Komplex 2 (TSC2), welcher die mTOR-Aktivität negativ reguliert [44]. In verschiedenen in vitro und Tierversuchen konnte eine antitumorale Wirkung von Metformin nachgewiesen werden [32, 33, 35, 36, 39, 45-47]. Das Protein mTOR wird durch den PI3K/AKT-Signalweg aktiviert, welcher durch Insulin und Wachstumsfaktoren wie IGF-1, EGF, PDGF und VEGF induziert wird. Der PI3K/Akt-Signalweg reguliert mTOR durch Phosphorylierung und damit Inaktivierung des negativen Regulators TSC2 von mTOR [48]. Hohe Spiegel von Insulin und IGF tragen zur mTOR Überexpression bei, erhöhen die Zellproliferation und die Apoptoseresistenz in Tumorzellen [49]. Zusätzlich konnten AMPK unabhängige antiproliferative Wirkungen von Metformin nachgewiesen werden [32, 50].

1. Einleitung

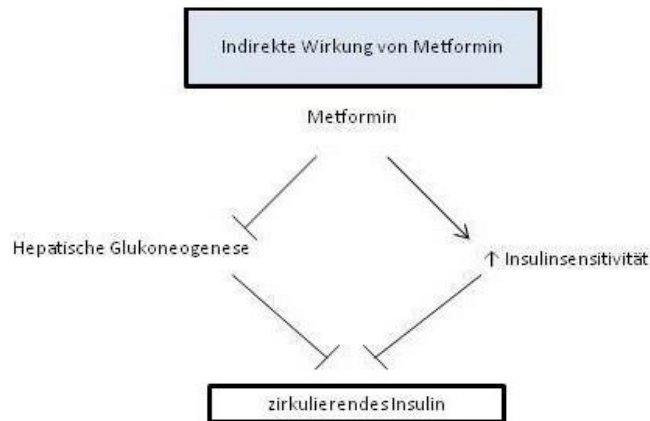


Abbildung 1 angelehnt an [18]

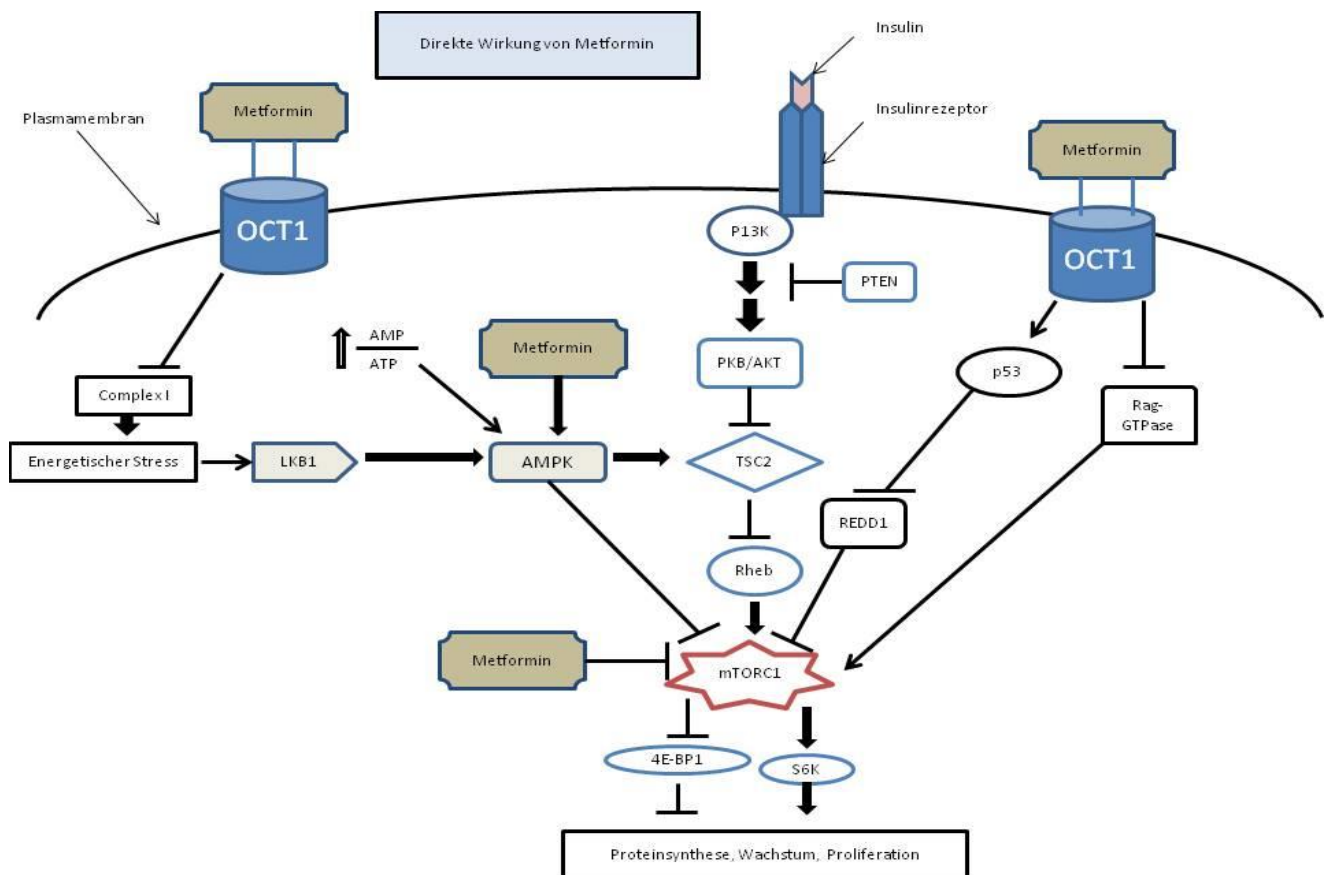


Abbildung 2 angelehnt an [18, 29]: Metformin aktiviert AMPK was zu einer Stabilisierung von TSC2 führt und zur Hemmung des mTORC1 Signals und der Proteinsynthese. Metformin kann auch direkt mTOR als Ziel haben, unabhängig von AMPK und TSC2.

AMPK = AMP-aktivierte Proteinkinase, 4E-BP1 = eukaryotische Initiationsfaktor 4E-Bindungsprotein-1; LKB1 = Leberkinase B1; mTORC1 = mammalian target of Rapamycin-Komplex 1, PI3K = Phosphatidylinositol-3-Kinase, PKB / Akt = Proteinkinase B; PTEN = phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10; Rheb = Ras homologue enriched in brain, S6K = ribosomale Protein S6 Kinase; TSC2 =Tuberöse Sklerose Komplex 2.

2. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Neuroendokrine Tumore sind eine sehr heterogene Gruppe von Tumoren [1], welche bisher nur chirurgisch kurativ behandelt werden können [5]. Aus diesem Grund sind neue Therapieoptionen notwendig.

Bei 15 % der neuroendokrinen Pankreastumore (pNET) können Mutationen im PI3K/Akt/mTOR-Signalweg nachgewiesen werden [51]. Everolimus, ein mTOR-Inhibitor wurde von der FDA zur Behandlung von pNET zugelassen und zeigt eine signifikante Verbesserung des progressionsfreien Überlebens [7, 51].

In verschiedenen Arbeiten wurde als Wirkmechanismus von Metformin die Aktivierung von AMPK und eine daraus resultierende Hemmung des mTOR-Signalwegs nachgewiesen [16].

Zielsetzung dieser Arbeit war es nachzuweisen, ob Metformin auch auf neuroendokrinen Tumorzellen antiproliferative Wirkungen in vitro über die Hemmung des mTOR-Signalwegs ausübt.

Hierfür wurden humane neuroendokrine Tumorzelllinien des Pankreas (BON1), des Dünndarms (GOT1) und der Lunge (NCI-H727) jeweils mit Metformin in verschiedenen Dosierungen und Inkubationszeiten behandelt und Zellviabilitäts-Assay's, Zellzahl-Zählversuche, Western Blots und FACS-Analysen durchgeführt.

3. Material und Methoden

3.1. Material

Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
6-Aminocaproic acid	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ammoniumpersulfat 50 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Amphotericin B	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Blotting Grade Blocker Non-Fat Dry Milk	BIO-RAD Laboratories GmbH, München, Deutschland
Bromphenolblau	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay System Technical Bulletin	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
Countess® Cell Counting Chamber Slides	Invitrogen™, Carlsbad, Kalifornien, USA
DMEM/F12-Medium (1:1) [GIBCO® Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12]	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
DMSO [Dimethylsulfoxid]	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
EDTA (Titrplex III) [Ethylendiamintetraessigsäure]	Merck Chemicals, Darmstadt, Deutschland
Fetales Kälberserum (FKS)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Halt Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Hepes [2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure]	Boehringer Mannheim Chemicals, Deutschland
IGF-1	Amersham Pharmacia Biotech Europe, Deutschland
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Metformin hydrochlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen bei München, Deutschland
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
M-Per-Puffer Mammalian Protein Extraction Reagent	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

Natriumchlorid	Merck Chemicals, Darmstadt, Deutschland
PBS [Phosphat-gepufferte Salzlösung]	Apotheke Klinikum München, Deutschland
Precision Plus Protein™ Standard Dual Colors	BIO-RAD Laboratories GmbH, München, Deutschland
Rapamycin	Biomol, Hamburg, Deutschland
Restore™ Plus Western Blot Stripping Buffer	Thermo Scientific, IL, USA
Rotigel 30 (30 % Acrylamid)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Rotiphorese SDS-Page	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Roti®-Quant Universal	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
RPMI 1640-Medium	PAA Laboratories, Linz, Österreich
SDS ultra pure	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Sodium orthovanadate	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
SuperSignal West Dura Luminol (Enhancer Solution)	Thermo Fisher Scientific, Ulm, Deutschland
SuperSignal West Dura Stable Peroxide Buffer	Thermo Fisher Scientific, Ulm, Deutschland
TEMED [Tetramethylethylendiamin]	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trizma Base	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trypanblau	Life technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA
Trypsin	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Tween® 20	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Tabelle 4 verwendete Chemikalien

Geräte

Gerät	Hersteller
AGFA Curix 60	AGFA, Deutschland
BD Accuri® C6 flow cytometer	BD Biosciences, San Jose, California, USA
Brutschrank CO2-AutoZero	Heraeus Instruments, Osterode, Deutschland
Countess™ Automated Cell Counter	Invitrogen™, Carlsbad, Kalifornien, USA
Elektrophoresekammer Protean II xi Cell	BIO-RAD Laboratories GmbH, München, Deutschland
Labornetzgerät TNG 30	Voltcraft, Deutschland
Medingen Wasserbad W-22	Funke Medingen, Deutschland
Mikroskop-CK2	Olympus, Japan
Mikrozentrifuge MC13	Millipore, MA, USA
Oberflächen- und Analysenwaage	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Orbital Shaker OS-20	Kisker Biotech, Steinfurt, Deutschland
Photometer-Sunrise	TECAN, Männerdorf, Schweiz
Power Pac 3000	BIO-RAD Laboratories GmbH, München, Deutschland
Semi-Dry-Western-Blot-Graphitelektroden	Laborwerkstätten, Klinikum Großhadern, München, Deutschland
Sicherheitswerkbank LaminAir	Heraeus instruments, Osterode, Deutschland
Wärmeblock	Grant instruments, Cambridge, UK
Zentrifuge und Vortex	ELMI, Riga, Lettland

Tabelle 5 verwendete Geräte

Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Chromatography paper1/3CHR	Whatman GmbH, Dassel, Deutschland
Electric Koch- und Gefrierfolie Typ FO 70	Petra, Deutschland
Eppendorfgefäße	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Medical-X-Ray-Film, Super RX	FUJI, USA
Plastikpipetten	Costar, Corning, USA
Multiwell-96-Well	Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Multiwell-12-Well	Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Multiwell-6-Well	Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Pasteurpipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Präzisionspipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Transfermembran Immobilon P, PVDF hydrophob, Porengröße 0,45 µM	Millipore, MA, USA
Zellkulturflaschen 250/750 ml	Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Zellkulturflaschen Nunclon Surface 250 ml	Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Zellschaber	Sigma-Aldrich, MO, USA
Zentrifugenröhrchen	Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland

Tabelle 6 eingesetztes Verbrauchsmaterial

Verwendete Puffer:

Puffer	Inhalt
SDS-Probenpuffer:	0,25M Tris Hcl, 40 % Glycerol, 2 % Natriumdodezylsulfat (SDS), 1 % Dithiothreitol, Bromphenolblau pH 8,8
Lysispuffer:	50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 10 mM Na ₄ P ₂ O ₇ , 100 mM NaF und 2 mM Natriumorthovanadate, pH 7,4
TBS-T-Puffer (Waschpuffer)	0,02M Trizma®base(Sigma-Aldrich, MO, USA)+ 0,15M NaCl, 0,1 %Tween® 20, 0,01% Natriumacid
Milchpulver-TBS-T-Puffer:	0,02M Tris HCl, 0,15M NaCl, 2 %, 0,01 % Natriumacid
Nicoletti-Puffer:	1 % Sodiumcitrat, 0,1 % Triton X-100 und 50µg/ml Propidiumjodid

Tabelle 7 verwendete Puffer

3.2. Methoden

Zellkulturmethoden

Verwendete NET-Zelllinien:

Zelllinie	Primarius	Verwendetes Medium + Zusätze
BON1	Humaner neuroendokriner Tumor des Pankreas [52], Mit freundlicher Unterstützung von Prof. R. Göke (Marburg, Deutschland)	DMEM/F12 + 10 % FKS + 1 % Penicillin-Streptomycin + 0,2 % Amphotericin B
NCI-H727	Humanes, typisches Karzinoid der Lunge [53], Kommerziell erhalten durch ATCC (VA, USA)	RPMI + 10% FKS + 1 % Penicillin-Streptomycin + 0,2% Amphotericin B
GOT1	Humaner Dünndarmtumor [54] Mit freundlicher Unterstützung von Prof. O.Nilsson (Göteborg, Schweden)	RPMI + 10 % FKS + 1 % Penicillin-Streptomycin + 0,2 % Amphotericin B + Insulin (0,135 IE/ml) + ApoTransferrin (5 mg/ml)

Tabelle 8

Allgemeines:

Alle drei NET-Zelllinien (BON1, NCI-H727 und GOT1) wurden bei 37°C, in Wasserdampf gesättigter und 5 % CO₂ enthaltener Atmosphäre im Begasungsbrutschrank kultiviert.

Um Kontaminationen der Zellkulturen zu vermeiden wurden alle Arbeiten an einer sterilen Sicherheitswerkbank mit Laminar-Air-Flow durchgeführt.

Die Kultivierung der BON1- und NCI-H727-Zellen fand in Falcon-Zellkulturflaschen mit 75 cm² (Becton-Dickinson, Deutschland) und der GOT1-Zellen in den „nunclon surface“-Zellkulturflaschen (Becton-Dickinson, Deutschland) statt.

Bestimmung der Zellzahl:

Die Zellzahl wurde mittels dem Countess™ Automated Cell Counter (Invitrogen) bestimmt.

Um abgestorbene Zellen aus der Zählung auszuschließen, wurden diese mit Trypanblau (Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA) markiert.

Zellviabilitäts-Assay:

Um für den Zellviabilitäts-Assay auf allen Platten eine annähernd gleiche Zelldichte zu erreichen (BON1 - 500 Zellen/ Well, NCI-H727 – 4000 Zellen/ Well, GOT1 – 50000 Zellen/ Well), wurden die Zellen aller drei Zelllinien entsprechend ihrer Wachstumsgeschwindigkeit zu unterschiedlichen Mengen auf 96-Well-Platten ausgesät. Danach wurden die Zellen für 24 Stunden herangezüchtet.

Im Anschluss dazu wurde das jeweilige Medium durch Serum-reiches (10 % FKS) Medium, welches frei von Penicillin/ Streptomycin und Amphotericin B war, ersetzt. Dieses Medium enthielt in ansteigenden Konzentrationen Metformin (von 0,1-0,5-1-5 -10 mM).

Nach 72, 144 bzw. 216 Stunden wurde die Zellproliferationsrate mittels dem CellTiter 96®-Kit entsprechend der Herstellerinstruktion bestimmt. Zu diesem Zweck wurde jedes Well mit 2 µl des Cell Titers für drei Stunden inkubiert.

Im Anschluss wurde mittels des Photometers Sunrise RC Remonte Control die Extinktion bei 492 nm gemessen.

Proteinextraktion und Western Blot-Analyse

Proteinextraktion:

Um die Wirkung von Metformin auf Proteinebene zu untersuchen wurden Western Blot-Analysen durchgeführt.

Hierzu wurden die NET-Zelllinien auf 6-Well-Platten ausgesät. Die Anzahl der Zellen (0,3 Mio. BON1-Zellen/ Well, 0,4 Mio. NCI-H727-Zellen/ Well und 1 Mio. GOT1-Zellen/ Well) wurde wieder entsprechend ihrer Wachstumsgeschwindigkeit angepasst, um in allen Wells nach 24 Stunden eine einheitliche Dichte zu erhalten.

Nach 24-stündiger Kultivierung der Zellen wurde das Medium durch Serum-reiches Medium (10 % FKS), ohne Penicillin/ Streptomycin bzw. Amphotericin B, ersetzt. In diesem Medium waren die bekannten Konzentrationen von Metformin (mit 0,1-0,5-1-5-10 mM) enthalten. Nach einer 24-/48-stündigen Inkubation der Zellen, wurde das Medium aus jedem Well abgesaugt.

Die Platten wurden mit PBS gewaschen, der Überstand erneut abgesaugt und jedes Well mit 200 µl M-Per-Puffer und Proteaseinhibitor (10µl pro ml M-Per-Puffer) bedeckt.

Danach wurden die Platten über Nacht bei -40°C aufbewahrt. Am nächsten Tag wurden die Proben aufgetaut und jedes Lysat in jeweils ein Eppendorfgefäß überführt, welches daraufhin bei 13000 g für 10 Minuten zentrifugiert wurde. Anschließend wurde der Überstand abpipettiert und die Proteinkonzentrationen unter Verwendung der Proteinbestimmung nach Bradford (Roti®-Quant, Carl Roth, Deutschland) ermittelt und ein Proteinkonzentrations-Ausgleich mittels Lysisbuffer durchgeführt.

Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot:

Um die Proben für die Proteinextraktion zu denaturieren wurden sie mit einem SDS-Probenpuffer 1:4 versetzt und bei 95°C für 5 Minuten aufgekocht. Danach wurden in die Polyacrylamid-Gel-Taschen (T= 10 %, T= 12 %, T= 15 %; Acrylamidkonzentration (T) entsprechend den zu untersuchenden Proteinmolekulargewichtsmassen) 50-70µl des Protein-Puffer-Gemischs, welches etwa 5-20µg Protein enthielt, gegeben und bei 50 mA / 200 V nach dem relativen Molekulargewicht aufgetrennt.

Der Precision Plus Protein™ Standard Dual Colors wurde hierbei als Molekulargewichtsstandard verwendet.

Danach wurden mithilfe eines Semi-Dry-Blotters die aufgetrennten Proteine innerhalb von 60 min auf eine PVDF-Membran elektrotransferiert und somit immobilisiert. Diese PVDF-Membran wurde dann in TBS-T gewaschen und mittels einer 30-minütigen Behandlung mit dem Milchpulver-TBS-T-Puffer geblockt. Danach wurde die Membran über Nacht mit dem jeweiligen Erstantikörper bei Raumtemperatur inkubiert (siehe Tabelle 9). Am folgenden Tag wurde die Membran auf einem Rotationsschüttler dreimal für je 10 Minuten gewaschen.

Darauf folgte die Inkubation der Membran mit dem Zweitantikörper (siehe Tabelle 10) für zwei Stunden und anschließende gründliche Waschung. Anschließend wurde die Membran für 15 Minuten mit dem Super-Signal-West-Dura-Chemolumineszenz-Substrat versetzt, um die Peroxidase-Aktivität des Zweitantikörpers nachzuweisen und das hierbei entstehende Chemolumineszenz auf dem FUJI Medical-X-Ray-Film festzuhalten. Der Film wurde in einer AGFA Curix60 entwickelt. Mittels dem Restore™ Plus Western Blot Stripping Buffer wurden die PVDF-Membranen anschließend „gestrippt“ und damit die Antikörper wieder von der Membran abgelöst. Die PVDF-Membranen wurden, nach gründlichem Waschen, anschließend in der gleichen Vorgehensweise mit einem weiteren Erstantikörper versetzt und der Versuch nun mit diesem erneut durchgeführt.

Primärer Antikörper	Hersteller	Verdünnung
Anti-Akt (#2920)	Cell Signaling Technology, MA, USA	1:10000
Anti-β-Actin (A5441 Sigma)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA	1:100000
Anti-EGFR (#4267)	Cell Signaling Technology, MA, USA	1:10000
Anti-Erk 1/2 (# 06-182)	Upstate (Millipore), Merck Millipore Headquarters, MA, USA	1:25000
Anti-GSK3 (#9315)	Cell Signaling Technology, MA, USA	1:25000
Anti-IGF1-R (#3027)	Cell Signaling Technology, MA, USA	1:5000
Anti-pAkt (Ser 473) (#4060)	Cell Signaling Technology, MA, USA	1:5000
Anti-pAMPK (Thr172) (#2535)	Cell Signaling Technology, MA, USA	1:2000
Anti-PARP (#9542)	Cell Signaling Technology, MA, USA	1:1000
Anti-pERK (Thr202/Tyr204) 1/2 (#4370)	Cell Signaling Technology, MA, USA	1:10000
Anti-pP70S6K (Thr389) (#9234)	Cell Signaling Technology, MA, USA	1:1000
Anti-P70S6K (#9202)	Cell Signaling Technology, MA, USA	1:2500
Anti-p4EBP1 (Ser65) (#9451)	Cell Signaling Technology, MA, USA	1:2000
Anti-4EBP1 (#9644)	Cell Signaling Technology, MA, USA	1:20000
Anti-pS6 (Ser235/6 (#4858) und Ser240/4 (#5364))	Cell Signaling Technology, MA, USA	1:5000 (S235/6), 1:100000 (S240/4)
Anti-S6 (#2317)	Cell Signaling Technology, MA, USA	1:10000
Anti-pGSK3 (Ser21/9) (#9331)	Cell Signaling Technology, MA, USA	1:5000

Tabelle 9

Sekundärer Antikörper	Hersteller	Verdünnung
Meerrettich Peroxidase konjugierter Zweitantikörper – Maus, #7076	Cell Signaling Technology, MA, USA	1:25000
Meerrettich Peroxidase konjugierter Zweitantikörper – Kaninchen, #7074	Cell Signaling Technology, MA, USA	1:25000

Tabelle 10

FACS-Analyse

Zur Quantifizierung der DNA-Fragmentation und zur Analysierung der Effekte von Metformin auf den Zellzyklus wurden Durchflusszytometrien durchgeführt.

Hierfür wurde die etablierte Versuchsanleitung nach Nicoletti I. et al. [55] verwendet.

Es wurden die gleichen Versuchsanordnungen sowie 6-Well-Platten wie bei den Western Blot-Analysen verwendet, d.h. die Zellen wurden wieder entsprechend ihrer Wachstumsgeschwindigkeit ausgesät (0,3 Mio. BON1-Zellen/ Well, 0,4 Mio. NCI-H727-Zellen/ Well und 1 Mio. GOT1-Zellen/ Well).

Nach 24-stündiger Kultivierung der Zellen wurde das Medium durch Serum-reiches (10 % FKS) und die bekannten Konzentrationen von Metformin (mit 0,1-0,5 –1 –5 - 10 mM) enthaltenem Medium, ohne Penicillin/ Streptomycin bzw. Amphotericin B, ersetzt. Nach 24 bzw. 72 Stunden wurde das Medium bei abgelösten Zellen, nach mikroskopischer Kontrolle, in ein Eppendorfgefäß überführt. Falls dies nicht der Fall war, wurde das Medium abgesaugt.

Im Anschluss wurde jedes Well mit 1 ml PBS gewaschen und bei schwimmenden Zellen in das vorherige Eppendorfgefäß überführt. Wenn keine schwimmenden Zellen vorhanden waren wurde das PBS abgesaugt.

Nach einer 2- bis 3-minütigen Behandlung der Wells mit Trypsin und nachfolgender Waschung mit Medium wurden die restlichen abgelösten Zellen in das jeweilige Eppendorfgefäß überführt.

Im Anschluss wurden die Zellen bei 2000 Umdrehungen für 5 Minuten abzentrifugiert und der Überstand abgesaugt.

Nach erneuter Waschung mit PBS und Resuspendierung der Zellpellets wurden die Eppendorfgefäße erneut bei 2000 Umdrehungen für 5 Minuten zentrifugiert.

Nach Entfernung des Überstandes wurden die Zellpellets mit 350 µl Nicoletti-Puffer (hypotonem Puffer) resuspendiert und bei -4°C für 24 Stunden aufbewahrt.

Im Anschluss wurde die Durchflusszytometrie mittels dem BD Accuri® C6 flow cytometer durchgeführt.

In der nachfolgenden Auswertung der Ergebnisse wurden die Zellkerne links des „G1-Gipfels“ als apoptotisch betrachtet.

Zellzählversuche:

Um die lebenden und toten Zellen zu quantifizieren wurden Zählversuche der Zellen nach Inkubation mit Metformin durchgeführt.

Hierfür wurden die Zellen erneut entsprechend ihrer Wachstumsgeschwindigkeit (0,1 Mio. BON1-Zellen/ Well, 0,15 Mio. NCI-H727-Zellen/ Well) ausgesät.

Wie in den Versuchsansätzen für die Western Blot- und FACS-Analysen wurde die gewünschte Anzahl von Zellen auf 6-Well-Platten übertragen. Nach 24 Stunden wurde das Medium durch Serum-reiches (10 % FKS) und die bekannten Konzentrationen von Metformin (mit 0,1-0,5-1-5-10 mM) enthaltenes Medium, ohne Penicillin/ Streptomycin bzw. Amphotericin B, ersetzt. Anschließend wurde nach 72, 144 bzw. 216 Stunden das Medium der einzelnen Wells jeweils in ein Falcon abpipettiert und die einzelnen Wells mit PBS gewaschen und ebenfalls in die Falkons hinzugegeben. Nach einer Behandlung der einzelnen Wells mit Trypsin für 2-3 Minuten wurde erneut Medium hinzugegeben und die sich restlichen gelösten Zellen ins zugehörige Falcon übertragen. Anschließend wurden die Falkons für 4-5 Minuten bei 1200 Umdrehungen abzentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Im nächsten Schritt wurden die Zellpellets in 2 ml Medium resuspendiert.

Die anschließende Zellzählung wurde mithilfe des Countess™ Automated Cell Counters durchgeführt.

Hierfür wurden 10µl der Zellsuspension 1:1 mit Trypanblau (Life technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA) gemischt und davon jeweils 10µl in ein Countess® Cell Counting Chamber Slide gegeben. Nach Beendigung der Zählung wurden die in die Zählung eingeschlossenen Zellen nochmal mittels der zugehörigen Countess-Software nachkontrolliert und gegebenenfalls ausgebessert.

Statistik

Für die statistische Analyse wurde das Programm "Statistical Program for the Social Sciences-SPSS" (v.16.0) genutzt. Die statistische Analyse erfolgte mittels zweiseitigen t-Test, wobei $p < 0.05$, nach einer Bonferroni Korrektur, als statistisch signifikant betrachtet wurde.

4. Ergebnisse

4.1. Metformin inhibiert die Lebensfähigkeit und vermindert die Zellzahl von neuroendokrinen Tumorzellen

Die Behandlung der humanen neuroendokrinen Pankreas BON1-Zellen mit Metformin supprimiert die Zelllebensfähigkeit (Cell Titer assay; Promega) dosisabhängig (siehe Abbildung 3).

Signifikante Effekte sind nach 144 und 216 h zu beobachten. Eine Dosis von 5 mM Metformin supprimiert die Zelllebensfähigkeit auf $\sim 65 \pm 3 \%$ ($p=0.015$) und eine Dosis von 10 mM auf $\sim 55 \pm 8 \%$ ($p<0.05$). Nach 216 h supprimiert Metformin die Zelllebensfähigkeit auf $\sim 45 \pm 5 \%$ ($p=0.015$) (siehe Abbildung 3).

Die Zellzählungen, welche mittels des Countess™ Automated Cell Counters durchgeführt wurden, zeigen ähnliche Resultate (siehe Abbildung 4). Signifikante Effekte sind bei allen getesteten Zeitwerten zu beobachten, wobei nach 144 und 216 h eine signifikante Reduktion der Zellzahl bei einer Metformindosis kleiner als 0,5 mM zu sehen ist. Eine maximale Suppression (bis auf $\sim 20 \%$ nach 144 und 216 h) wird bei den höchsten getesteten Metformindosierungen beobachtet (5 und 10 mM).

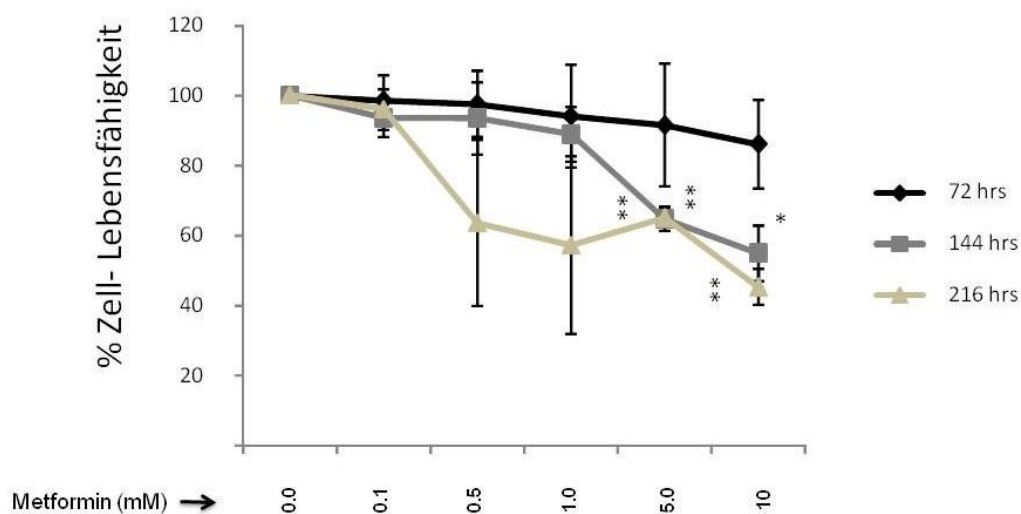


Abbildung 3 Hemmung der Lebensfähigkeit neuroendokriner BON1-Zellen durch Metformin:

Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängig durchgeführten Versuchen mittels des Zellproliferationsassays (Promega).

*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$ im Vergleich zu unbehandelten Kontrolle.

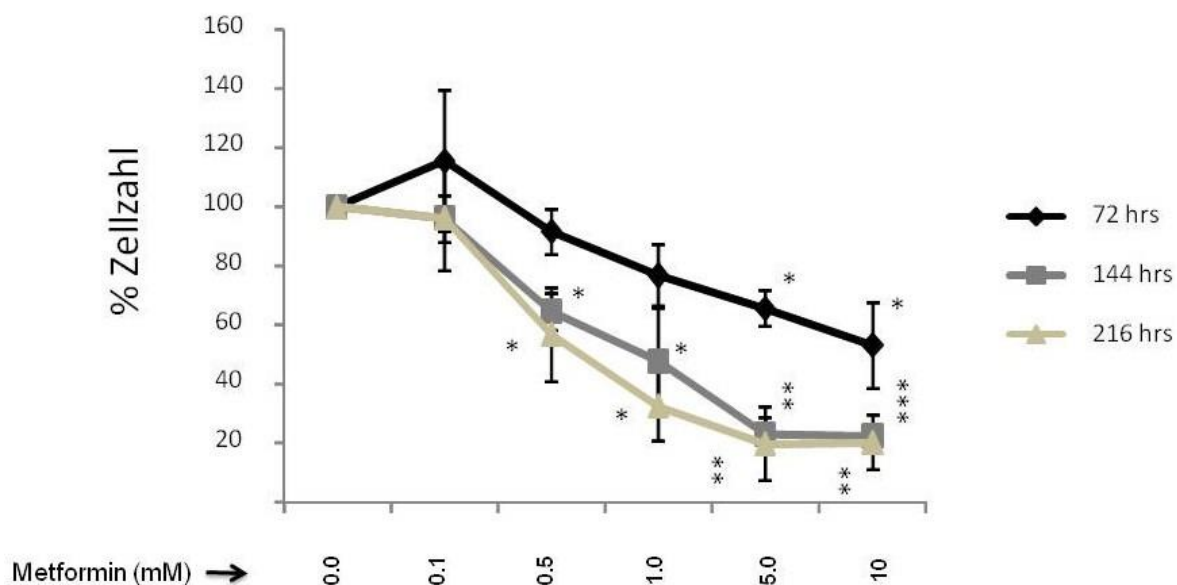


Abbildung 4 Abnahme der Zellzahl neuroendokriner BON1-Zellen durch Metformin:

Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängig durchgeführten Versuchen mit dem Countess™ Automated Cell Counter

*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$ im Vergleich zu unbehandelten Kontrolle.

Metformin supprimiert ebenfalls dosisabhängig die Zelllebensfähigkeit von humanen bronchopulmonalen NCI-H727-Zellen (siehe Abbildung 5). Signifikante inhibitorische Effekte sind zu allen getesteten Zeitwerten zu sehen bei einer Metformindosis von 5-10 mM. Maximale Effekte sind bei einer Metformindosis von 10 mM mit einer Inhibition der Zelllebensfähigkeit auf bis zu $\sim 55 \pm 8 \%$ ($p=0.007$), $30 \pm 10 \%$ ($p=0.004$) und $22 \pm 15 \%$ ($p=0.009$) nach jeweils 72 h, 144 h und 216 h zu beobachten.

Die Zellzählungen, welche mittels des Countess™ Automated Cell Counters durchgeführt wurden, zeigen ähnliche Resultate (siehe Abbildung 6). Signifikante Effekte sind nach 216 h ab einer Dosis von 0,5 mM (Suppression auf bis $\sim 51 \pm 17 \%$ ($p<0.05$)) und eine maximale Suppression (auf bis $\sim 20-30 \%$) bei den höchsten getesteten Dosierungen (5 und 10 mM) zu beobachten.

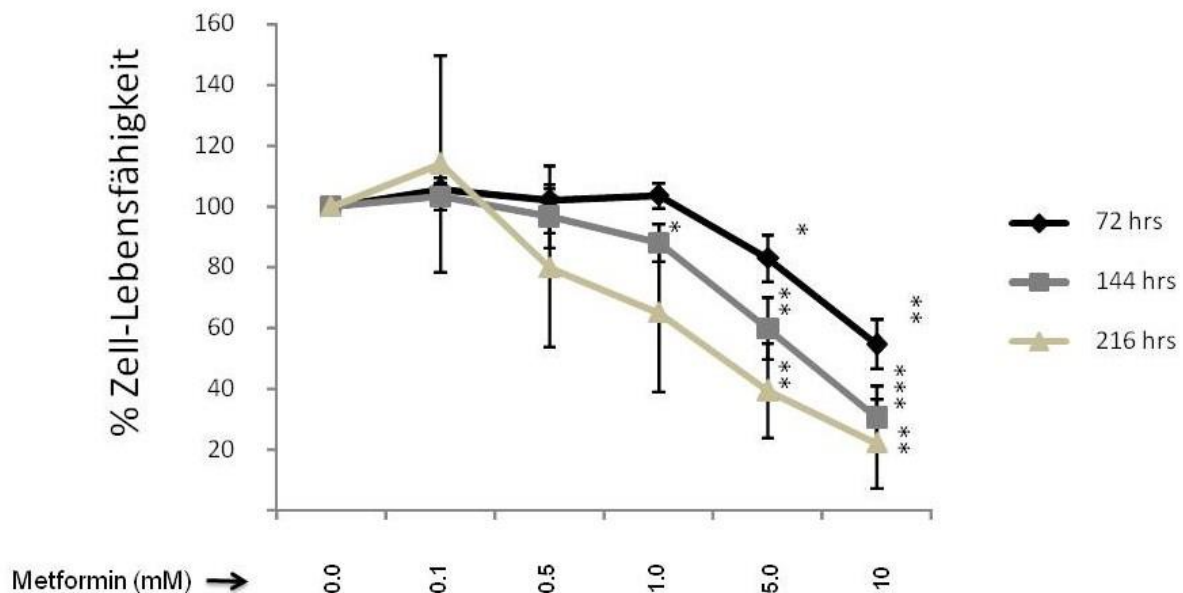


Abbildung 5 Hemmung der Lebensfähigkeit neuroendokriner NCI-H727-Zellen durch Metformin: Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängig durchgeführten Versuchen mittels des Zellproliferationsassays (Promega).

*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$ im Vergleich zu unbehandelten Kontrolle.

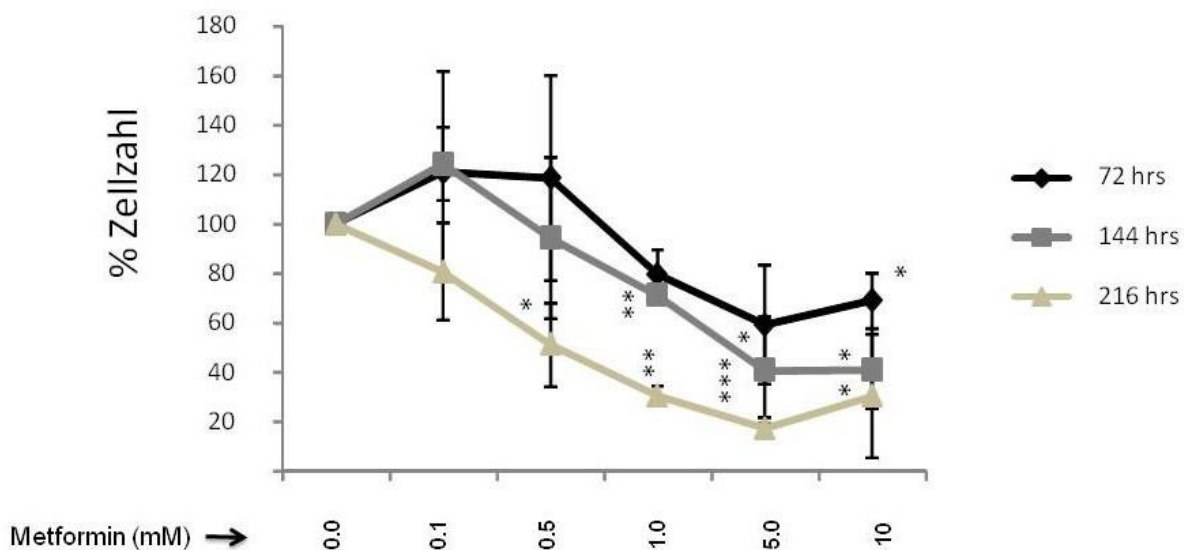


Abbildung 6 **Abnahme der Zellzahl neuroendokriner NCI-H727-Zellen durch Metformin:**

Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängig durchgeführten Versuchen mittels dem Countess™ Automated Cell Counter.

*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$ im Vergleich zu unbehandelten Kontrolle.

Humane neuroendokrine Mitteldarm GOT1-Zellen weisen eine hohe Sensitivität gegenüber der Behandlung mit Metformin auf (siehe Abbildung 7). Signifikante Effekte sind ab einer Dosierung von 0,5 mM (nach 72 h) zu sehen und eine dosisabhängige Verminderung der Zelllebensfähigkeit ist zu allen Zeitpunkten zu beobachten, mit einem Suppressionsmaximum auf ~ 10-20 %.

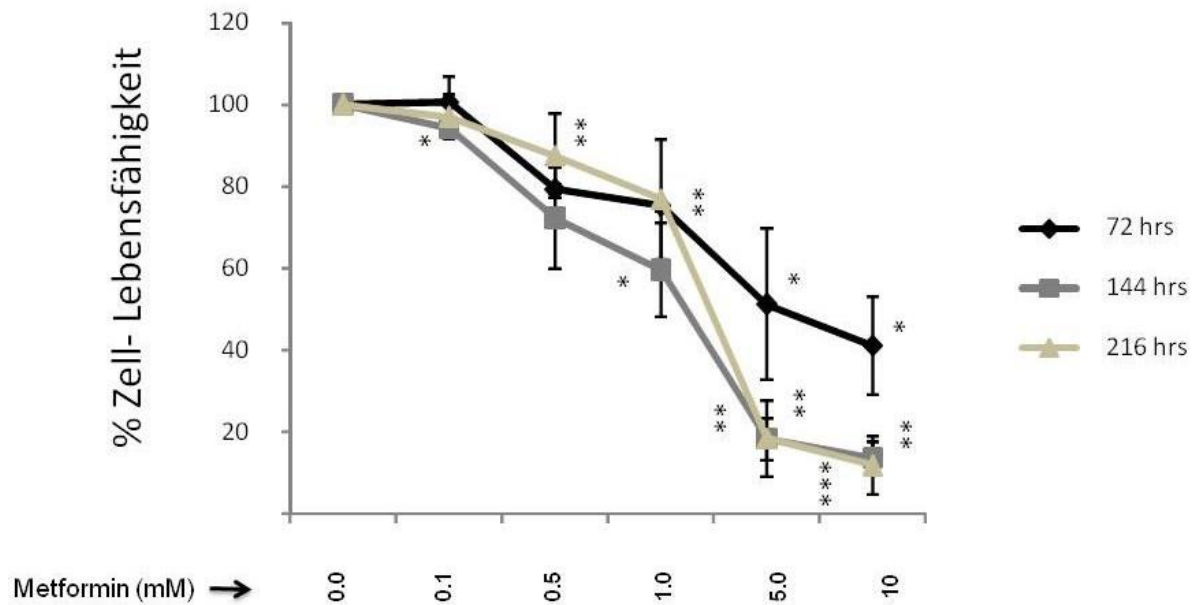


Abbildung 7 Hemmung der Lebensfähigkeit neuroendokriner GOT1-Zellen durch Metformin:

Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängig durchgeführten Versuchen mittels des Zellproliferationsassays (Promega).

*, p < 0,05; **, p < 0,01; ***, p < 0,001 im Vergleich zu unbehandelten Kontrolle.

4.2. Effekte von Metformin auf die AMPK-Phosphorylierung von neuroendokrinen Tumorzellen

Die Behandlung von humanen neuroendokrinen Tumorzellen mit Metformin hat abhängig von der verwendeten Zelllinie unterschiedliche Effekte auf die AMPK-Aktivität.

In humanen Pankreas BON1-Zellen induziert eine Behandlung mit 5 bis 10 mM Metformin für 48h eine AMPK-Phosphorylierung (siehe Abbildung 8). Neuroendokrine Mitteldarm GOT1-Zellen sind stark empfänglich gegenüber Metformin und der daraus resultierenden AMPK-Aktivierung (siehe Abbildung 9). So induzieren bereits niedrige Metformindosen von 1 mM eine AMPK-Phosphorylierung. Positive Effekte auf die AMPK-Phosphorylierung wurden zu allen getesteten Zeiten beobachtet (einschließlich 2 und 72h, hier nicht gezeigt).

Im Gegensatz dazu reagieren neuroendokrine bronchopulmonale NCI-H727-Zellen mit einer Suppression der Ausgangsbasis der AMPK-Phosphorylierung nach einer Behandlung mit Metformin (siehe Abbildung 10).

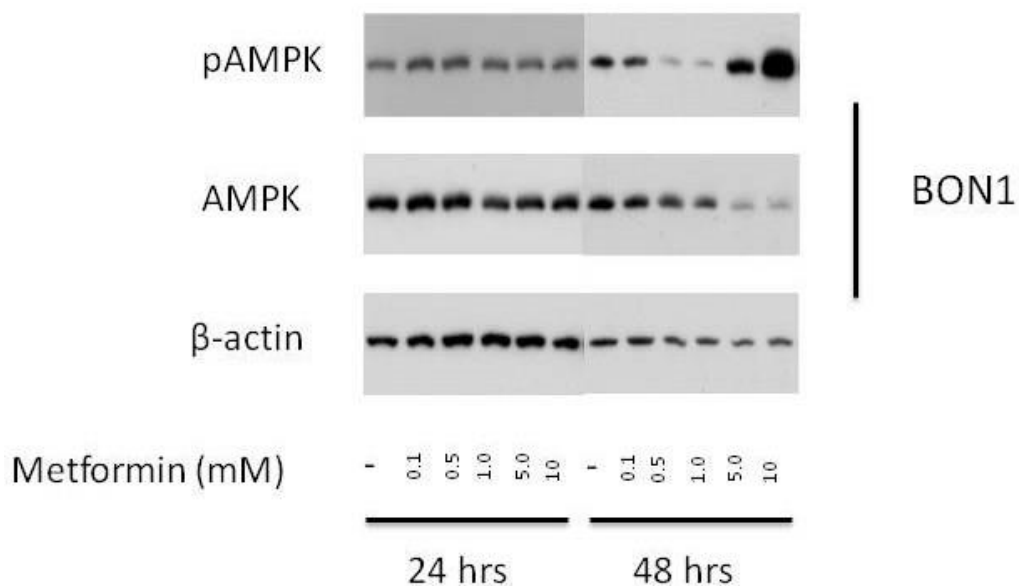


Abbildung 8 Effekt von Metformin auf die AMPK-Phosphorylierung von neuroendokrinen BON1-Tumorzellen: Die Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen von Metformin für 24 und 48 Stunden behandelt. Anschließend wurde die Expression von pAMPK, AMPK- und β -Actin-Ladkontrolle mittels Western Blot-Analysen ausgewertet. Es wird ein repräsentativer Blot aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten gezeigt.

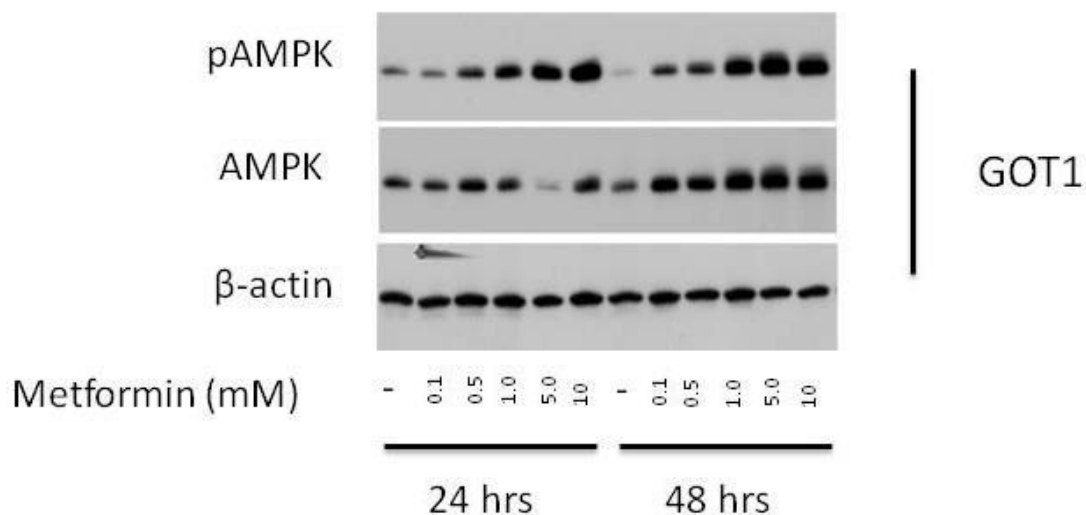


Abbildung 9 **Effekt von Metformin auf die AMPK-Phosphorylierung von neuroendokrinen GOT1-Tumorzellen:** Die Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen von Metformin für 24 und 48 Stunden behandelt. Anschließend wurde die Expression von pAMPK, AMPK-und β-Actin-Ladekontrolle mittels Western Blot-Analysen ausgewertet. Es wird ein repräsentativer Blot aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten gezeigt.

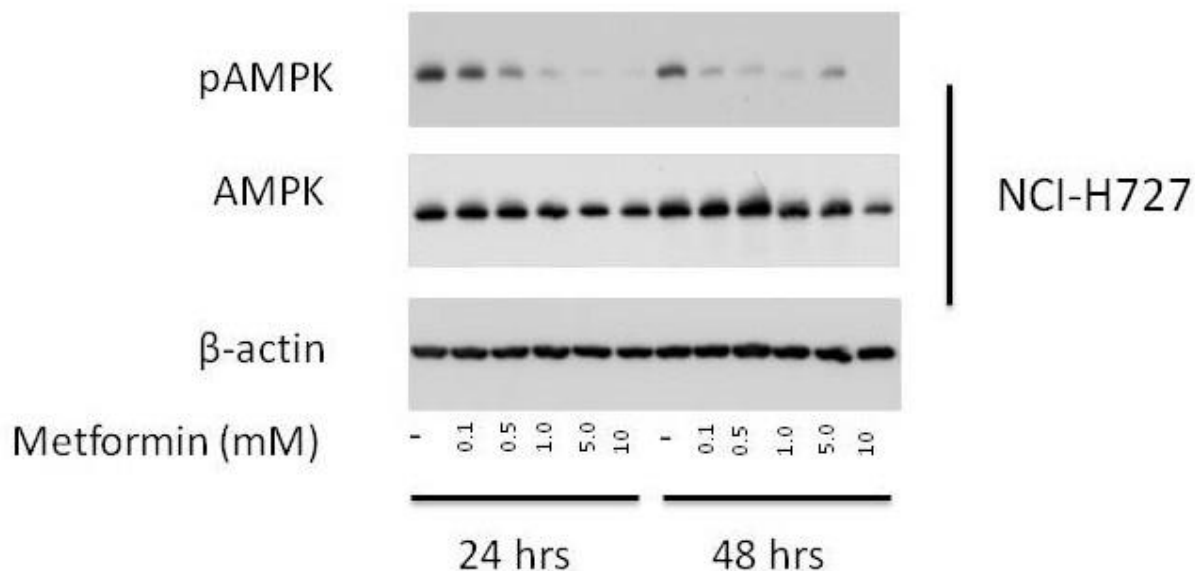


Abbildung 10 **Effekt von Metformin auf die AMPK-Phosphorylierung von neuroendokrinen NCI-H727-Tumorzellen:** Die Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen von Metformin für 24 und 48 Stunden behandelt. Anschließend wurde die Expression von pAMPK, AMPK-und β-Actin-Ladekontrolle mittels Western Blot-Analysen ausgewertet. Es wird ein repräsentativer Blot aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten gezeigt.

4.3. Effekte von Metformin auf den PI3K/AKT/mTOR-Signalweg

Die Behandlung von humanen Pankreas BON1-Zellen mit Metformin induziert insbesondere nach 48h dosisabhängig eine (am ehesten kompensatorische) AKT-Phosphorylierung (siehe Abbildung 11).

Die Hemmung des mTOR-Signalwegs durch Metformin ist an der Suppression der Phosphorylierung von p4EBP1 (siehe Abbildung 11), pP70S6K und S6 zu sehen (siehe Abbildung 12).

Metformin supprimiert potent, bei einer Dosierung kleiner als 0,5 mM, die 4EBP1- und S6- (an Ser 235/6) Phosphorylierung (siehe Abbildung 12), während nur geringe inhibitorische Effekte auf die Proteinexpression von IGFR beobachtet werden.

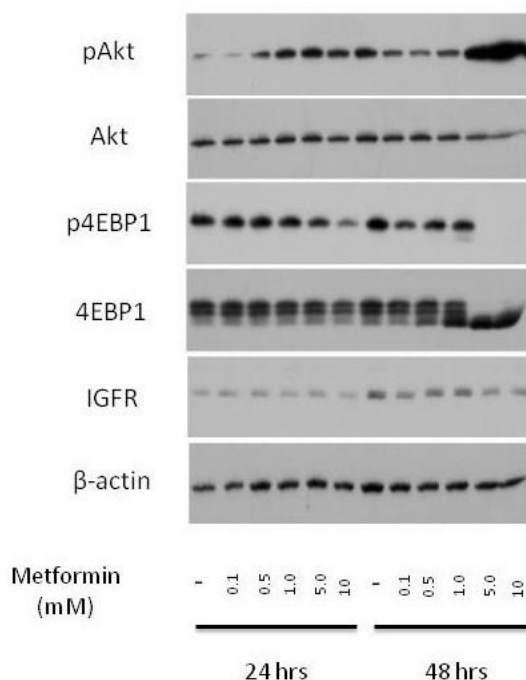


Abbildung 11 Wirkung von Metformin auf das PI3K/AKT/mTORC1-Signal in neuroendokrinen BON1-Tumorzellen: Humane pankreatische neuroendokrine BON1-Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen von Metformin für 24 und 48 Stunden behandelt. Anschließend wurde die Expression von pAKT, AKT, pEBP1, EBP1, IGFR und β-Actin-Ladekontrolle mittels Western Blot-Analysen ausgewertet. Es wird ein repräsentativer Blot aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten gezeigt.

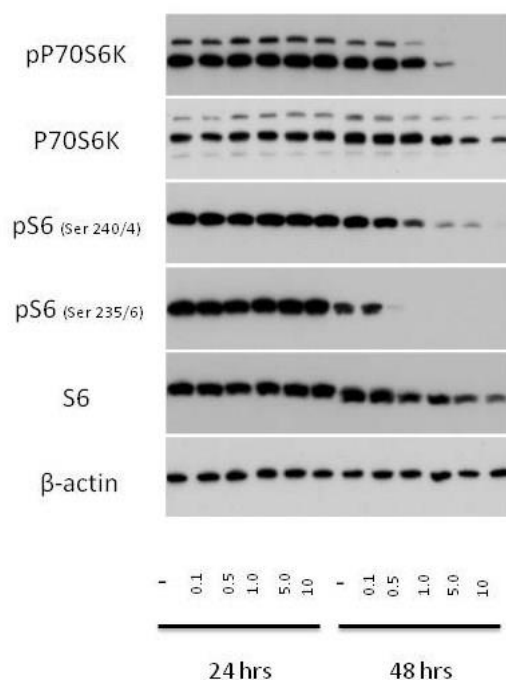


Abbildung 12 Wirkung von Metformin auf das PI3K/AKT/mTORC1-Signal in neuroendokrinen BON1-Tumorzellen: Humane pankreatische neuroendokrine BON1 Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen von Metformin für 24 und 48 Stunden behandelt. Anschließend wurde die Expression von pP70S6K, p70S6K, PS6, S6 und β -Actin-Ladekontrolle mittels Western Blot-Analysen ausgewertet. Es wird ein repräsentativer Blot aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten gezeigt.

In neuroendokrinen bronchopulmonalen NCI-H727-Zellen supprimiert Metformin die Phosphorylierung von AKT in höheren Dosen (1-10 mM), während bei geringeren Dosen (0,1-0,5 mM) die AKT-Phosphorylierung ansteigt (bei 48 h, siehe Abbildung 13).

Bei Dosierungen von 0,5-1 mM supprimiert Metformin die Phosphorylierung der mTOR nachgeschalteten Zielproteine 4EBP1 (siehe Abbildung 13), P70S6K und S6 (siehe Abbildung 14). Es werden keine großen Wirkungen auf die Proteinexpression von IGFR beobachtet.

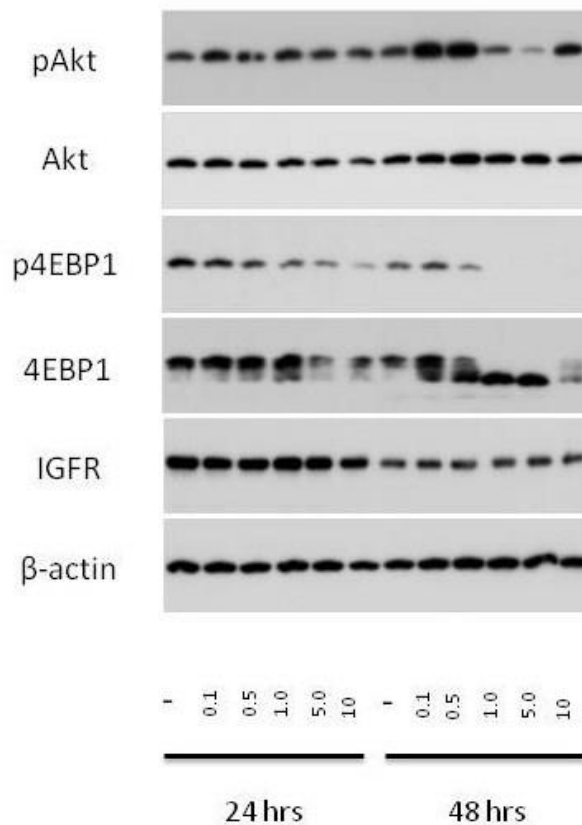


Abbildung 13 Wirkung von Metformin auf das PI3k/AKT/mTORC1-Signal in neuroendokrinen NCI-H727-Tumorzellen: Humane bronchopulmonale neuroendokrine NCI-H727-Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen von Metformin für 24 und 48 Stunden behandelt. Anschließend wurde die Expression von pAKT, AKT, pEBP1, EBP1, IGFR und β-Actin-Ladekontrolle mittels Western Blot-Analysen ausgewertet. Es wird ein repräsentativer Blot aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten gezeigt.

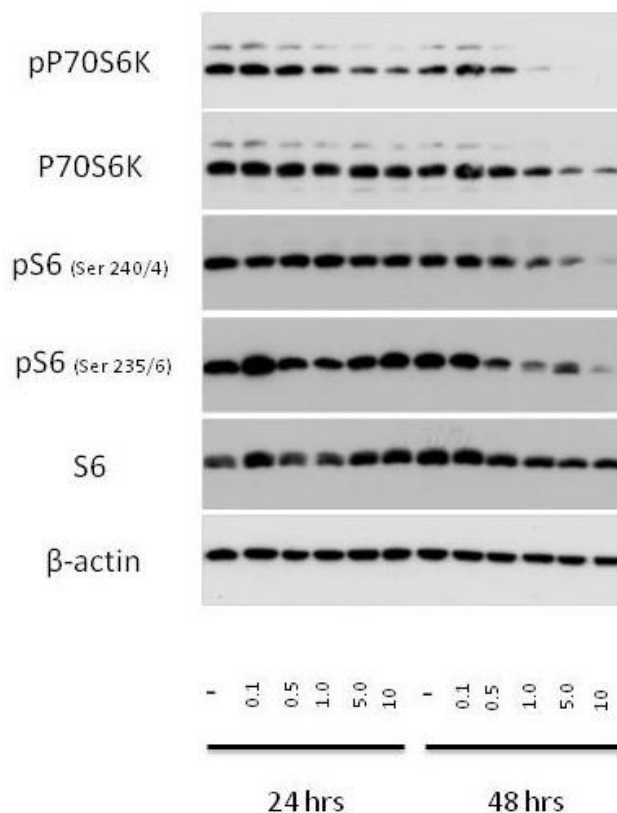


Abbildung 14 Wirkung von Metformin auf das PI3K/AKT/mTORC1-Signal in neuroendokrinen NCI-H727-Tumorzellen: Humane bronchopulmonale neuroendokrine NCI-H727-Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen von Metformin für 24 und 48 Stunden behandelt. Anschließend wurde die Expression von pP70S6K, p70S6K, PS6, S6 und β-Actin-Ladekontrolle mittels Western Blot-Analysen ausgewertet. Es wird ein repräsentativer Blot aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten gezeigt.

Die neuroendokrinen Mitteldarm GOT1- Zellen reagieren ebenfalls mit einer Verminderung der Phosphorylierung (insbesondere nach 48h) der mTOR nachgeschalteten Zielproteine 4EBP1 (siehe Abbildung 15), P70S6K und S6 (siehe Abbildung 16).

Ähnlich zu den BON1-Zellen kommt es abhängig von der Metformindosis zu einer zunehmenden AKT-Phosphorylierung nach 24 und 48h (siehe Abbildung 15).

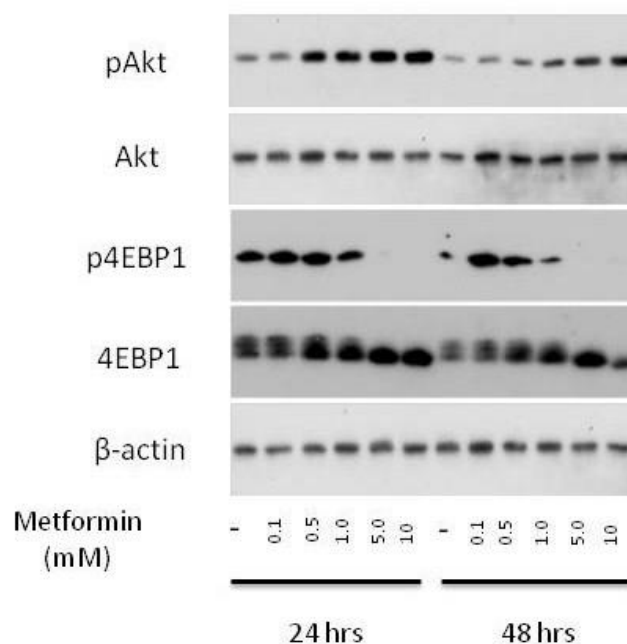


Abbildung 15 Wirkung von Metformin auf das PI3k/AKT/mTORC1-Signal in neuroendokrinen GOT1-Tumorzellen: Humane neuroendokrine GOT1-Zellen des Mitteldarms wurden mit den angegebenen Konzentrationen von Metformin für 24 und 48 Stunden behandelt. Anschließend wurde die Expression von pAKT, AKT, pEBP1, EBP1 und β -Actin-Ladekontrolle durch Western Blot-Analysen ausgewertet. Ein repräsentativer Blot aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten wird gezeigt.

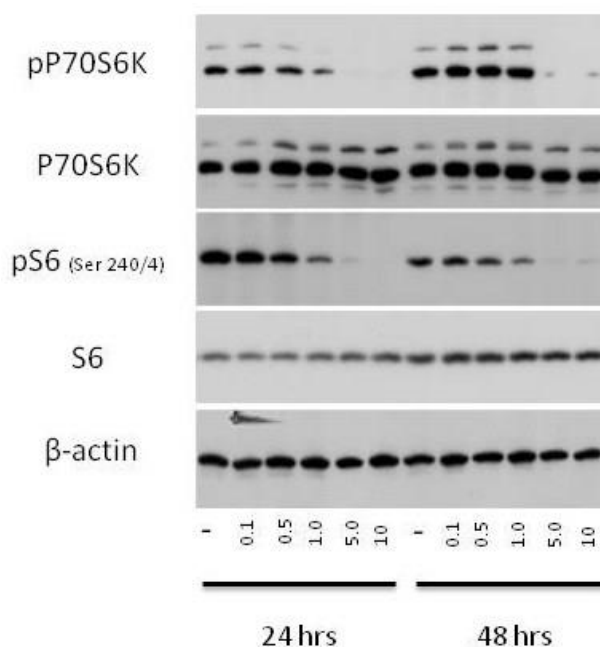


Abbildung 16 Wirkung von Metformin auf das PI3k/AKT/mTORC1-Signal in neuroendokrinen GOT1-Tumorzellen: Humane neuroendokrine GOT1-Zellen des Mitteldarms wurden mit den angegebenen Konzentrationen von Metformin für 24 und 48 Stunden behandelt. Anschließend wurde die Expression von pP70S6K, p70S6K, PS6, S6 und β -Actin-Ladekontrolle durch Western Blot-Analyse ausgewertet. Ein repräsentativer Blot aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten wird gezeigt.

Eine spezifische Behandlung von neuroendokrinen BON1 und NCI-H727-Zellen unter Serum-freien Bedingungen mit IGF-1 induziert eine schnelle (nicht dargestellt) und anhaltende Phosphorylierung des IGF-Rezeptors sowie eine Phosphorylierung von AKT (insbesondere in BON1 Zellen) und mTOR nachfolgend eine S6-Phosphorylierung (siehe Abbildung 17).

In einer Dosis-Wirkungs-Kurve mit Verwendung eines breiten Spektrums an Metformin-Dosen hatten in beiden getesteten Zelllinien auch hohe Metformin Konzentrationen keine Wirkung auf die IGF-1-induzierte IGFR-Phosphorylierung. Im Gegensatz zu den Zellen, welche in Vollmedium (siehe Abbildung 11- Abbildung 14) kultiviert wurden, beobachteten wir unter Serum-freien Bedingungen keinen (Abbildung 17) wesentlichen Effekt von Metformin auf die basale oder IGF-1-induzierte AKT-Phosphorylierung. Jedoch unterdrückt Metformin dosisabhängig das mTOR nachgeschaltete Signal durch Hemmung der basalen und IGF-1-induzierten S6-Phosphorylierung. Diese Hemmung der basalen und IGF-1-induzierten S6-Phosphorylierung durch Metformin war ähnlich der Hemmung der S6-Phosphorylierung durch den etablierten mTOR-Inhibitor Rapamycin, welcher als Positivkontrolle (Abbildung 17) verwendet wurde.

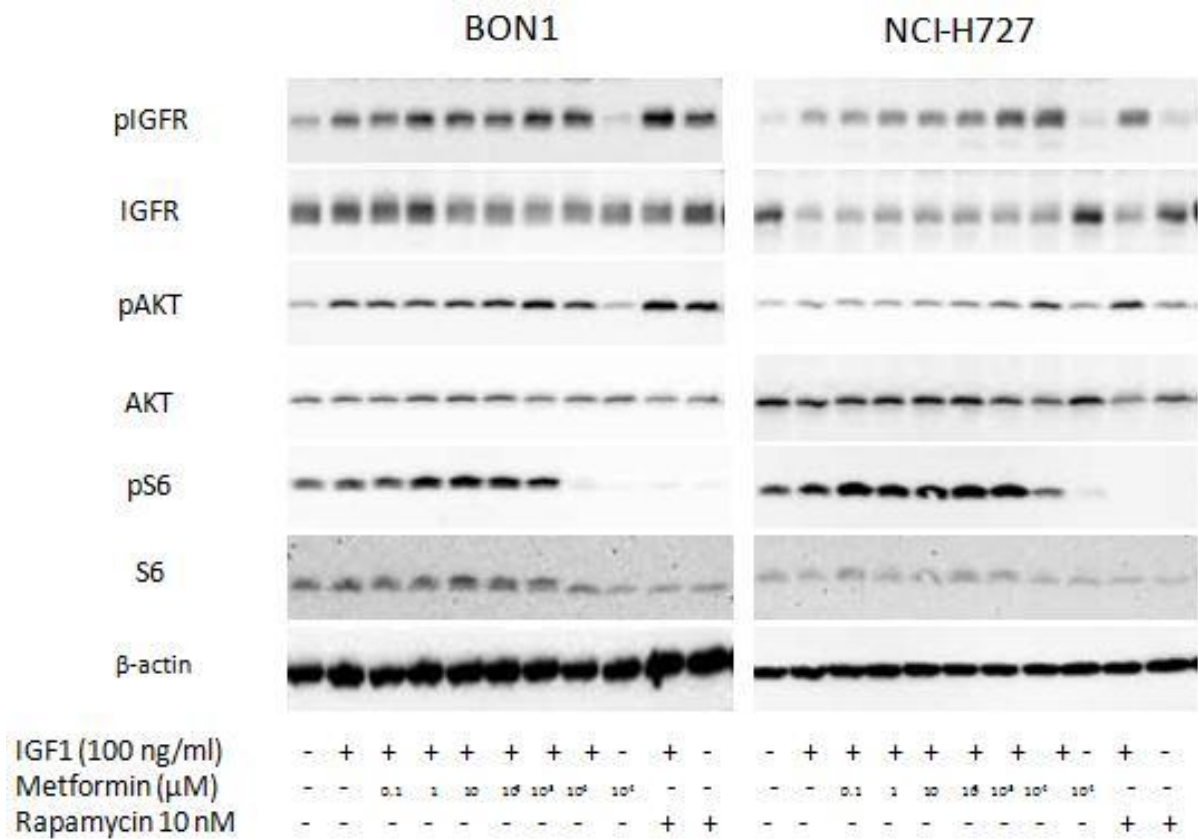


Abbildung 17 Die Wirkung von Metformin und Rapamycin auf den IGF1 induzierten Signalweg in neuroendokrinen Tumorzellen: Humane Pankreas BON1 (links) und NCI-H727 bronchopulmonale (rechts) neuroendokrine Tumorzellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen von Metformin oder Rapamycin 1 Stunde vor der Zugabe von IGF1 für 24 Stunden vorbehandelt. Die Expression von pIGFR, IGFR, PAKT, AKT, PS6, S6 und β-Actin-Ladekontrolle wurde mittels Western Blot-Analysen ausgewertet. Zu sehen ist ein repräsentativer Blot aus drei unabhängig durchgeführten Experimenten.

4.4. Effekte von Metformin auf die GSK3 und ERK Signalübertragung

Alle 3 Zellreihen reagieren mit einer dosisabhängigen Erhöhung der GSK3-Phosphorylierung (nach 24 und 48 h) bei den niedrigsten getesteten Metformindosierungen (0,1-0,5 mM; siehe Abbildung 18- Abbildung 20).

Die Effekte von Metformin auf die ERK-Phosphorylierung sind zwischen den verschiedenen neuroendokrinen Zelllinien unterschiedlich.

In pankreatischen BON1- und bronchopulmonalen NCI-H727-Zellen induziert Metformin eine ERK-Phosphorylierung mit einem Gipfel bei 1-5 mM (siehe Abbildung 18 und Abbildung 19).

Im Gegensatz dazu reagieren GOT1-Zellen mit einer dosisabhängigen Suppression der ERK-Phosphorylierung bei schon geringen Metformindosierungen (insbesondere nach 48 h, siehe Abbildung 20).

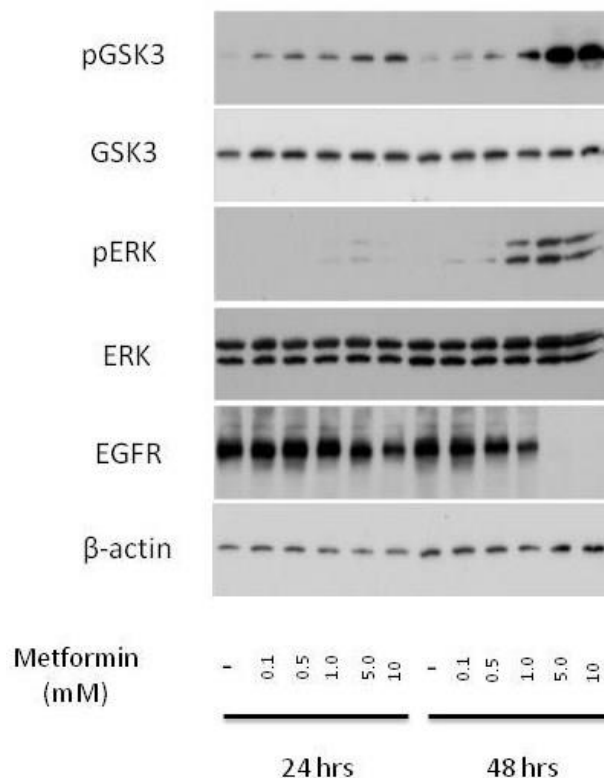


Abbildung 18 **Wirkung von Metformin auf das GSK3/ERK1/2-Signal in neuroendokrinen BON1-Tumorzellen:** BON1-Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen von Metformin für 24 und 48 Stunden behandelt. Anschließend wurde die Expression von pGSK3, GSK3, pERK1 / 2, ERK1 / 2, EGFR und β-Actin-Ladekontrolle durch Western Blot-Analysen ausgewertet. Ein repräsentativer Blot aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten wird gezeigt.

4. Ergebnisse

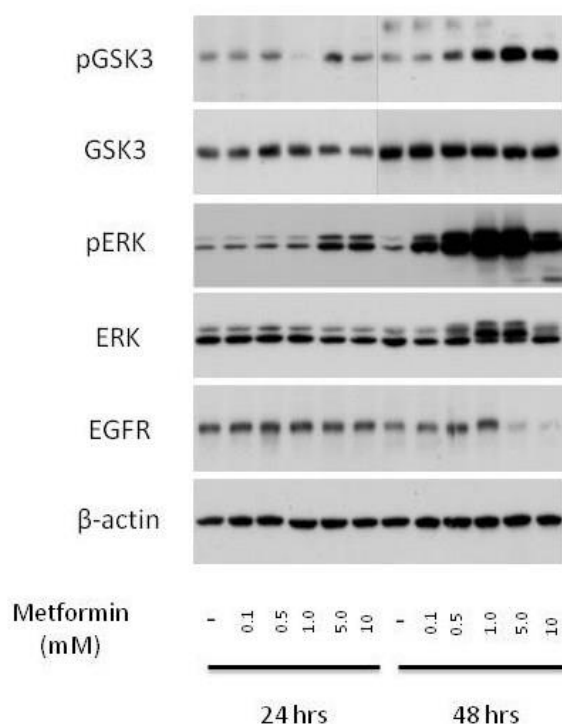


Abbildung 19 Wirkung von Metformin auf das GSK3/ERK1/2-Signal in neuroendokrinen NCI-H727-Tumorzellen: Humane bronchopulmonale NCI-H727-Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen von Metformin für 24 und 48 Stunden behandelt. Anschließend wurde die Expression von pGSK3, GSK3, pERK1/2, ERK1/2, EGFR und β-Actin-Ladekontrolle durch Western Blot-Analysen ausgewertet. Ein repräsentativer Blot aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten wird gezeigt.

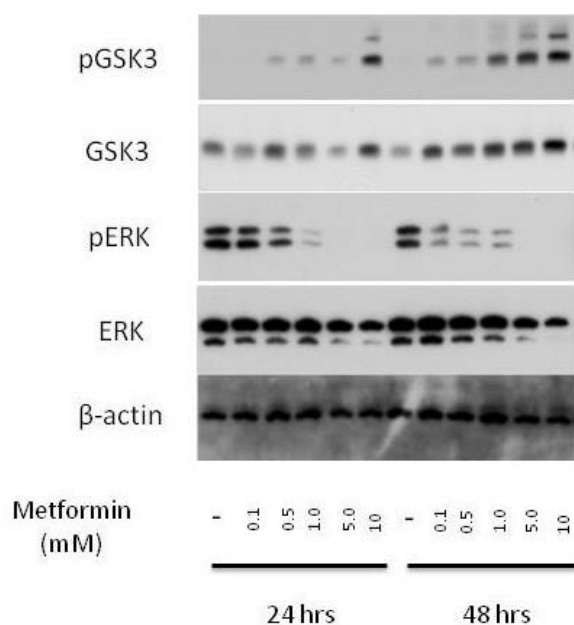


Abbildung 20 Wirkung von Metformin auf das GSK3/ERK1/2-Signal in neuroendokrinen GOT1-Tumorzellen: GOT1-Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen von Metformin für 24 und 48 Stunden behandelt. Anschließend wurde die Expression von pGSK3, GSK3, pERK1/2, ERK1/2 und β-Actin-Ladekontrolle durch Western Blot-Analysen ausgewertet. Ein repräsentativer Blot aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten wird gezeigt.

4.5. Effekte von Metformin auf die Apoptose von neuroendokrinen Tumorzellen

Um die Mechanismen für die Metformin-vermittelte Hemmung der Zellproliferation zu erkunden, bestimmten wir die Wirkung von Metformin auf die Sub-G0/1-Verteilung in neuroendokrinen Tumorzellen. Wie in Abbildung 21 und Abbildung 22 zu sehen, erhöht sich der Prozentsatz an BON1 und NCI-H727-Zellen in der Sub-G0/1-Phase durch die Behandlung mit Metformin nicht.

Interessanterweise reagieren BON1-Zellen mit einem leichten Rückgang der Sub-G0/1-Phase, als Reaktion auf eine 72 stündige Metformin-Behandlung. Die nicht vorhandene Apoptose-Induktion durch Metformin in diesen Zellen wird durch ein im Wesentlichen unberührtes cleaved PARP-Level (siehe Abbildung 21) bestätigt.

Im Gegensatz zu BON1- und NCI-H727-Zellen, induziert Metformin in GOT1-Zellen des Mitteldarmes eine Apoptose, was an dem erhöhten Anteil der Zellen in der Sub-G0/1-Phase (siehe Abbildung 23, linkes Bild) und der Induktion von PARP cleavage zu sehen ist (insbesondere nach 48 Stunden, siehe Abbildung 23, rechtes Bild).

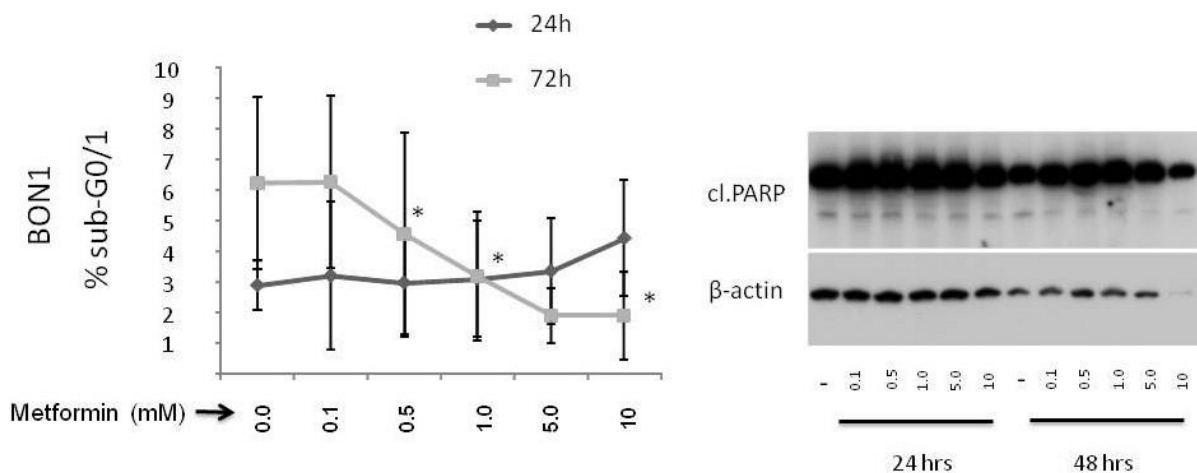


Abbildung 21 Wirkung von Metformin auf die Apoptose-Induktion in neuroendokrinen BON1-Tumorzellen:

Humane pankreatische neuroendokrine BON1-Zellen, welche in Komplettmedium kultiviert wurden, wurden mit den angegebenen Konzentrationen von Metformin behandelt. Nach 24 und 72 Stunden wurde der Anteil von Zellen in der Sub G0 /1-Phase mittels Durchflusszytometrie (linkes Bild) untersucht. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von 3 unabhängig durchgeführten Experimenten mit Doppelbestimmung, *, $p < 0,05$ im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die Expression von total/ cleaved PARP und β -Actin-Ladekontrolle wurde durch Western Blot-Analysen (rechtes Bild 24 und 48 Uhr) ausgewertet. Es wird ein repräsentativer Blot aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten gezeigt.

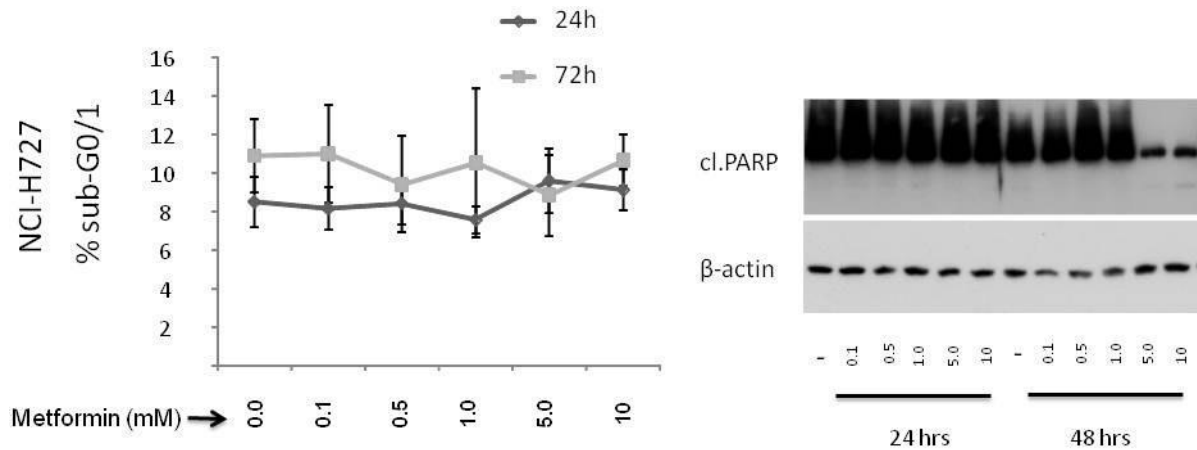


Abbildung 22 Wirkung von Metformin auf die Apoptose-Induktion in neuroendokrinen NCI-H727-Tumorzellen:

Humane bronchopulmonale neuroendokrine NCI-H727-Zellen, welche in Kompletmedium kultiviert wurden, wurden mit den angegebenen Konzentrationen von Metformin behandelt. Nach 24 und 72 Stunden wurde der Anteil von Zellen in der Sub G0/1-Phase mittels Durchflusszytometrie (linkes Bild) untersucht. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von 3 unabhängig durchgeführten Experimenten mit Doppelbestimmung, *, $p < 0,05$ im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die Expression von total/ cleaved PARP und β -Actin-Ladekontrolle wurde durch Western Blot-Analysen (rechtes Bild 24 und 48 Uhr) ausgewertet. Es wird ein repräsentativer Blot aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten gezeigt.

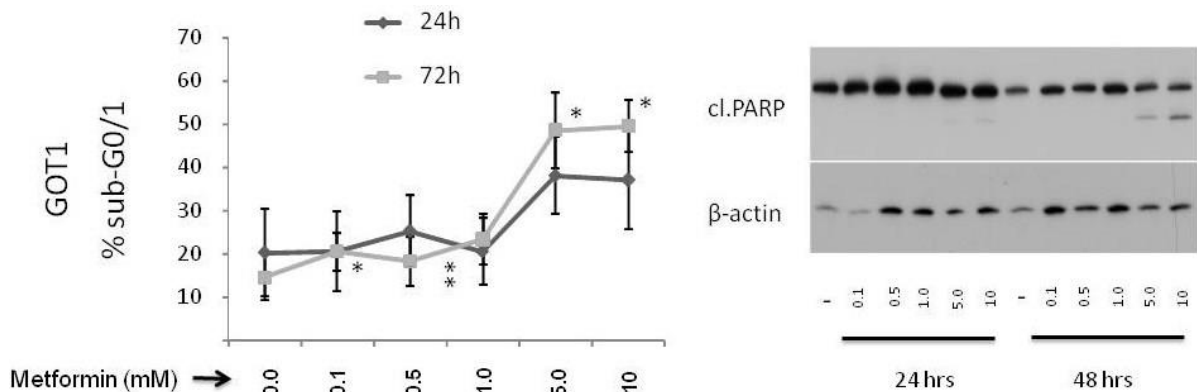


Abbildung 23 Wirkung von Metformin auf die Apoptose-Induktion in neuroendokrinen GOT1-Tumorzellen:

Humane Mitteldarm neuroendokrine GOT1-Zellen, welche in Kompletmedium kultiviert wurden, wurden mit den angegebenen Konzentrationen von Metformin behandelt. Nach 24 und 72 Stunden wurde der Anteil von Zellen in der Sub G0/1-Phase mittels Durchflusszytometrie (linkes Bild) untersucht. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von 2 unabhängig durchgeführten Experimenten mit Doppelbestimmung (N=4), *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$ im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die Expression von total/ cleaved PARP und β -Actin-Ladekontrolle wurde durch Western Blot-Analysen (rechtes Bild 24 und 48 Uhr) ausgewertet. Es wird ein repräsentativer Blot aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten gezeigt.

4.6. Effekte von Metformin auf die Zellzyklusverteilung von neuroendokrinen Tumorzellen

Die Behandlung von unsynchronisierten (in Kompletmedium kultivierten) neuroendokrinen Pankreas BON1-Zellen mit einer Metformindosis von ~ 1 mM für 72h reduziert den Prozentsatz an Zellen in der S-Phase von ~ 16 % auf ~ 10 % ($p=0.013$) und erhöht die Anzahl an Zellen in der G0/1-Phase von ~ 57 % auf ~ 65 % ($p=0.013$ bei 0.5 mM) (siehe Abbildung 24).

Ähnlich zu den bei den BON1-Zelle beobachteten Effekten reduziert Metformin dosisabhängig die Proliferation der NCI-H727-Zellen, was durch den reduzierten Eintritt in die S-Phase (von ~ 13 % auf min. ~ 8 % bei 1 mM; $p=0.001$) und G2/M-Phase (von ~27 % auf ~20 % bei 10 mM, $p<0.002$) und durch den erhöhten Prozentsatz an Zellen in der G0/1-Phase (von 51 % auf ~ 63 % bei 5 mM, $p<0.006$) nach 72 h bewiesen wird (siehe Abbildung 25).

Im Gegensatz dazu reagieren die neuroendokrinen Mitteldarm GOT1-Zellen mit einer dosisabhängigen Verminderung der Zellzahl in allen drei Phasen des Zellzyklus (siehe Abbildung 26), wahrscheinlich bedingt durch eine starke Apoptoseinduktion (siehe Abbildung 23).

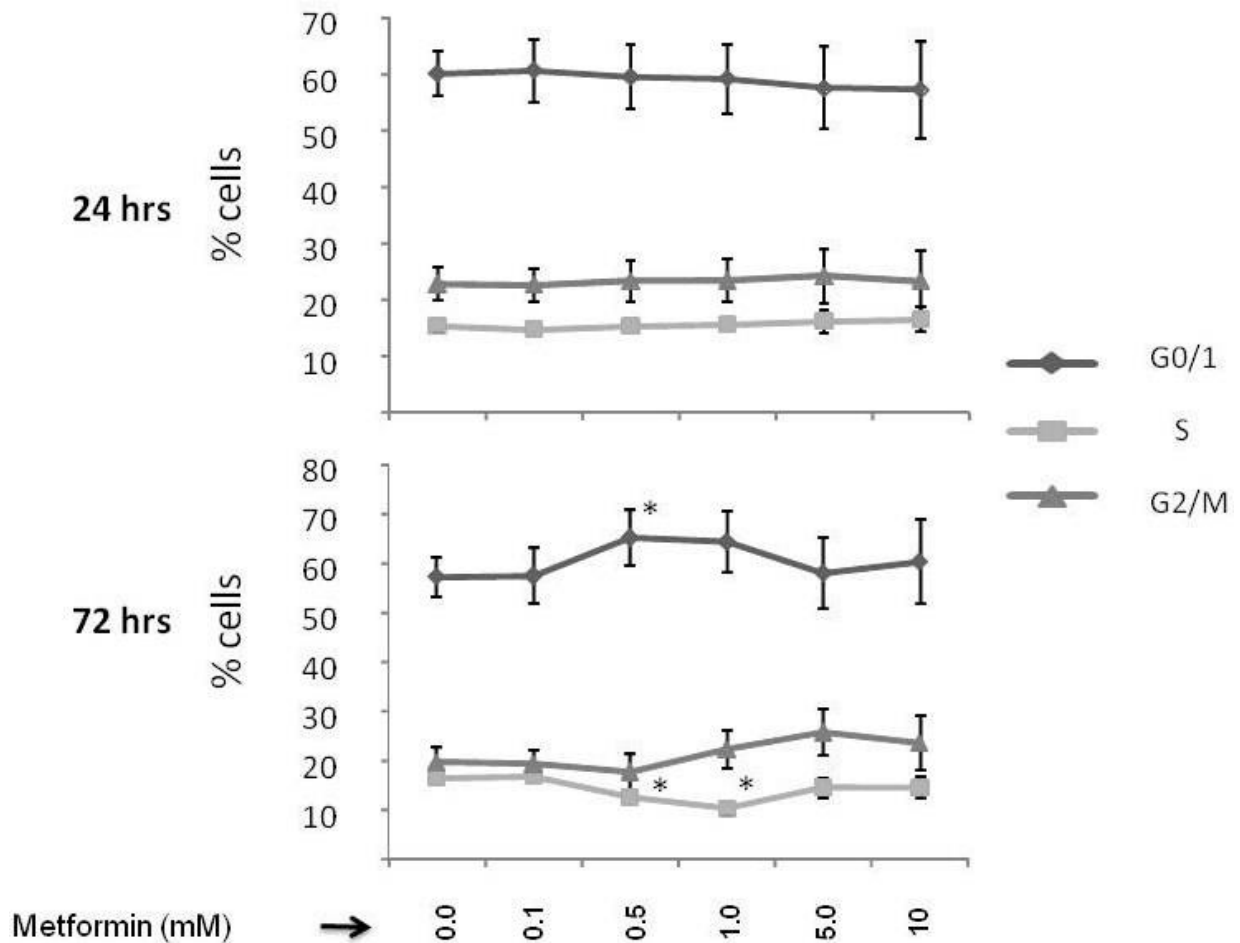


Abbildung 24 **Wirkung von Metformin auf die Zellzyklus-Verteilung neuroendokriner BON1-Tumorzellen:**

Humane pankreatische neuroendokrine BON1-Zellen, welche in Kompletmedium kultiviert wurden, wurden mit den angegebenen Konzentrationen von Metformin für 24 und 72 Stunden behandelt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD von 3 unabhängig durchgeführten Experimenten mit Doppelbestimmung ($n = 6$),

* $p < 0,05$ im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

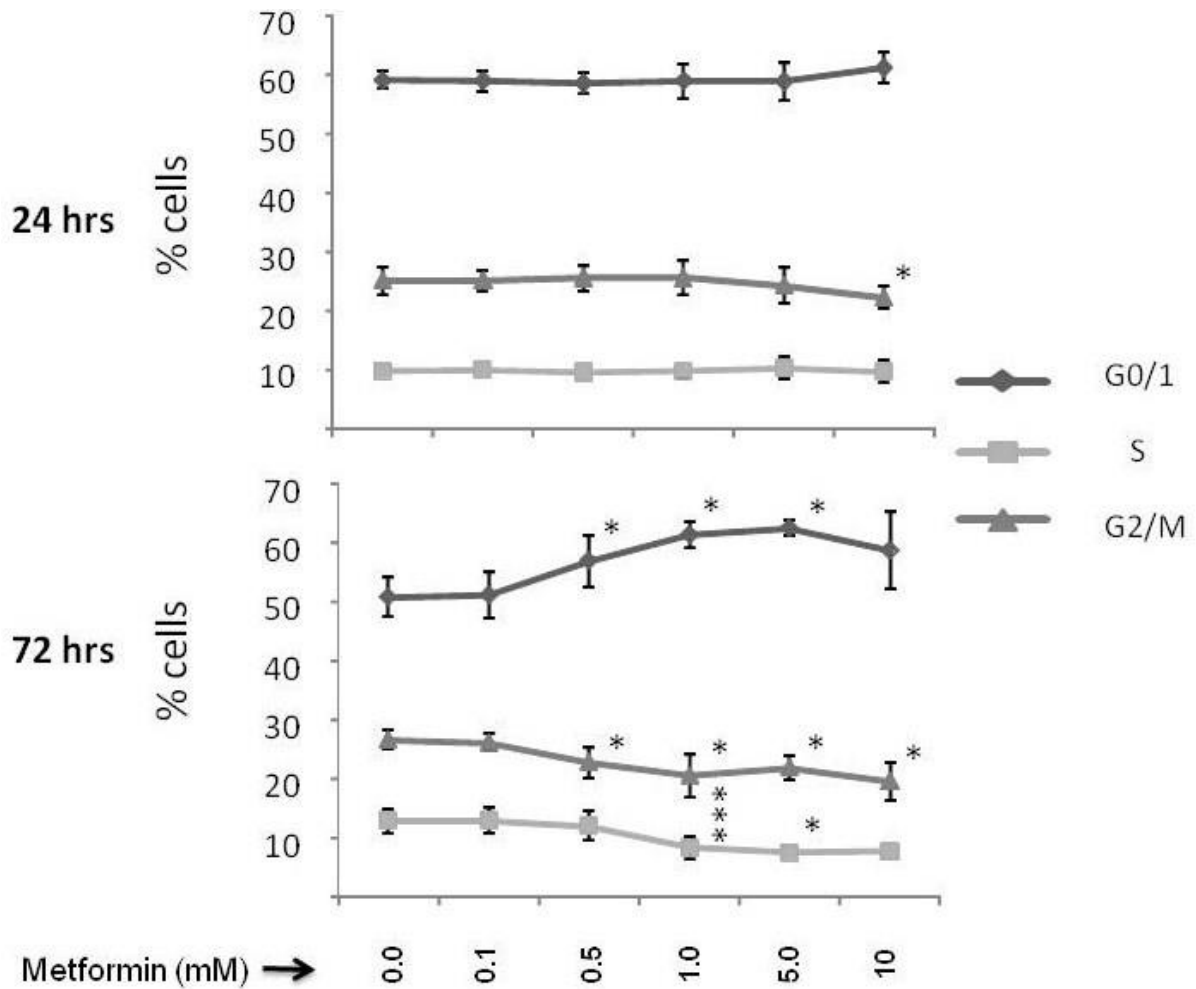


Abbildung 25 Wirkung von Metformin auf die Zellzyklusverteilung neuroendokriner NCI-H727-Tumorzellen:

Humane bronchopulmonale neuroendokrinen NCI-H727-Zellen, welche in Kompletmedium kultiviert wurden, wurden mit den angegebenen Konzentrationen von Metformin für 24 und 72 Stunden behandelt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD von 3 unabhängig durchgeführten Experimenten mit Doppelbestimmung (n = 6)

*, p < 0,05; ***, P < 0,001 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

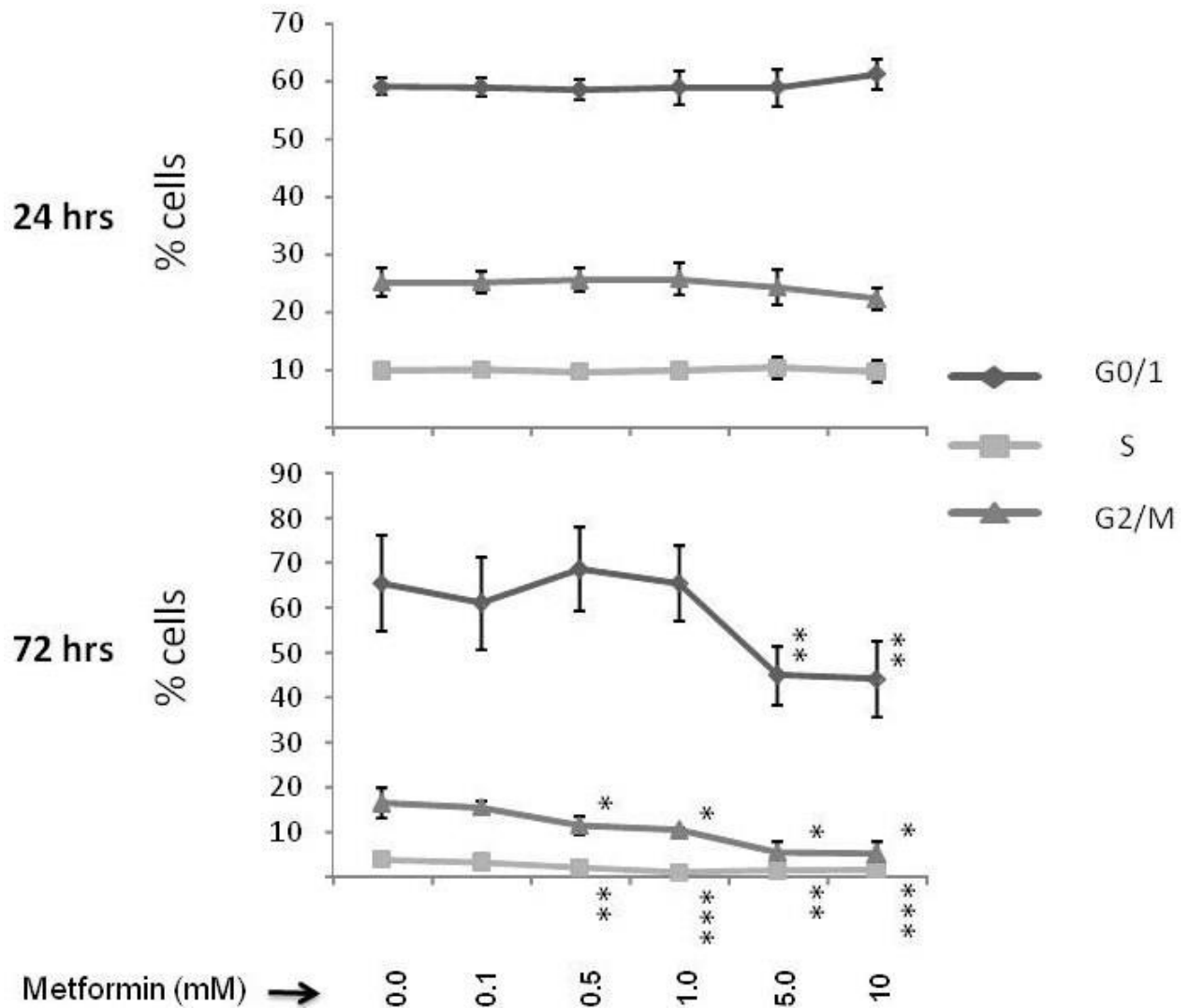


Abbildung 26 Wirkung von Metformin auf die Zellzyklusverteilung neuroendokriner GOT1-Tumorzellen:

Humane Mitteldarm neuroendokrine GOT-Zellen, welche in Kompletmedium kultiviert wurden, wurden mit den angegebenen Konzentrationen von Metformin für 24 und 72 Stunden behandelt, Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD von 2 unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten mit Doppelbestimmung (n = 4),

*, p < 0,05; **, p < 0,01; ***, p < 0,001 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

5. Diskussion

Gegenwärtig beinhaltet die konservative Therapie neuroendokriner Tumore verschiedene systemische Behandlungsoptionen:

Eine Biotherapie mit Somatostatinanaloga und Interferon- α , eine molekular zielgerichtete Therapie mit Everolimus und Sunitinib, zytotoxische Chemotherapieprotokolle sowie Peptidrezeptor-gerichtete Therapien sind etabliert [56-58].

Die zielgerichtete Therapie mit dem mTOR-Hemmer Everolimus [59] hat das therapeutische Spektrum für einen Teil der NET des Pankreas erweitert [57, 60].

Es werden jedoch weitere neue Therapiekonzepte benötigt [61, 62].

Zur Optimierung der konservativen Therapie neuroendokriner Tumore wird auch das orale Antidiabetikum Metformin in Betracht gezogen, da Metformin, wie Everolimus hemmende Einflüsse auf den mTORC1-Signalweg aufweisen kann [63-65], und Everolimus bereits als ein vielversprechendes Pharmakon für die antitumorale Therapie von NET bekannt ist [59, 66-68]

Außerdem konnte in mehreren Arbeiten gezeigt werden, dass sich eine Metformin-Therapie bei verschiedenen Tumoren positiv auf eine Behandlung auswirken kann [69].

Es wurde in verschiedenen Arbeiten berichtet, dass Metformin die Proliferation von Tumorzellen hemmt und eine Apoptose induziert, was das Ergebnis einer verringerten Verfügbarkeit an Energie durch ein erhöhtes AMP / ATP-Verhältnis und eine AMPK-Aktivierung ist. Die Fähigkeit von Metformin, den Zustand einer kalorischen Restriktion zu imitieren ist derzeit im Bereich der Onkologie von großem Interesse [70].

In diversen epidemiologischen Studien konnte bereits nachgewiesen werden, dass eine Behandlung mit Metformin das Tumorrisiko bei Patienten mit Diabetes mellitus senkt [17, 23].

So wurden in den letzten Jahren antitumorale Effekte von Metformin auf verschiedene Tumorzellen in vitro, in Tiermodellen und in klinischen Studien auch bei Patienten ohne Diabetes mellitus untersucht [39, 46, 71-73].

In einer klinischen Studie mit einer geringen Anzahl an präoperativen Brustkrebspatientinnen konnte gezeigt werden, dass sich nach einer zweiwöchigen Metformintherapie, der Prozentsatz an Zellen, welche mit Ki-67 anfärbbar sind, deutlich verminderte. Ki-67 fungierte dabei als ein prädiktiver Marker für die klinische/ pathologische Ansprechrate in der neoadjuvanten Situation. Parallel führte die Metforminbehandlung zu positiven Auswirkungen auf die Gene, welche Einfluss auf den Zellzyklus ausüben [38].

Außerdem konnte in einer Kurzzeitstudie gezeigt werden, dass Metformin in einer niedrigen Dosierung von 250 mg/d für einen Monat, die Anzahl und Größe von kolorektalen abnormalen Kryptenherden, einem endoskopischen Marker für kolorektale Karzinome, bei Patienten ohne Diabetes mellitus senkt [37].

Obwohl Metformin, wie bereits erwähnt, potente antitumorale Effekte in multiplen Tumortypen auszuüben scheint [29, 50, 64, 65], wurden potentielle Wirkungen auf neuroendokrine Tumore bisher nicht untersucht.

Mit dem Ziel Metformin in einem sogenannten „off-label use“ gegen neuroendokrine Tumore zu etablieren, wurden in dieser Arbeit daher die Einflüsse von Metformin auf die Zellzahl, die Zellüberlebensfähigkeit und den Zellzyklus von neuroendokrinen Tumorzellen analysiert.

Um die in der Studie gewonnenen Ergebnisse interpretieren zu können, muss man sich jedoch die bekannten molekularen Mechanismen von Metformin verinnerlichen:

Neben den indirekt/ insulinabhängigen Wirkungen von Metformin, wie Verminderung der Glukoneogenese und Erhöhung der Sensitivität der Muskulatur gegenüber Insulin [21] mit positiven Wirkungen auf Tumore durch gesenkte Insulinkonzentration, scheint Metformin über AMPK-abhängige und –unabhängige Wege zu wirken [29, 74, 75].

Metformin kann dabei über die Aktivierung des Tumorsuppressors Liver Kinase B1 (LKB1) zur Aktivitätssteigerung von AMPK führen. AMPK wiederum supprimiert durch Aktivierung des Tuberosen-Sklerose-Komplexes 2 (TSC2) oder durch Inhibition von Raptor das mTORC1-Signal und damit die Proteinsynthese [74, 75]. Zusätzlich zu der AMPK-abhängigen Hemmung des mTORC1-Signals, resultiert aus der Metformin vermittelten AMPK-Aktivierung eine p53-Phosphorylierung und ein p53

vermittelter Zellzyklusarrest oder Apoptose, abhängig vom p53 Mutationsstatus und dem Zelltypabhängigen p53-Signals [64, 65].

AMPK-unabhängige Effekte von Metformin beinhalten dagegen die Rag-GTPase vermittelte Hemmung von mTORC1, reduzierte Produktion des Tumornekrosefaktors alpha (TNF α), eine p53/p21 vermittelte Inhibition von Cyclin D1, Retinoblastoma-Protein (pRb) und einen G1-Zellzyklusarrest [64, 65].

Die Komplexität der Metforminwirkung ist zudem daran zu erkennen, dass abhängig vom Zelltyp die Hemmung der Zellproliferation entweder mit einem G0/1-, G2/M- oder auch einem S-Phase-Arrest assoziiert ist [29].

In der hier vorgelegten Arbeit wurde der Effekt von Metformin auf die Zellzahl, Zellviabilität und Zellzyklusverteilung in drei humanen neuroendokrinen Tumorzelllinien des Pankreas (BON1), bronchopulmonalen Systems (NCI-H727), und Mitteldarms (GOT1) untersucht.

Dabei supprimierte die Behandlung mit steigender Metforminkonzentration (0,1-10 mM) dosisabhängig die Zellproliferation und -lebensfähigkeit in allen 3 Zelllinien (siehe Abbildung 3 bis Abbildung 7, Seite - 35 - bis - 38 -).

Um die Wirkung von Metformin auf molekularer Ebene genauer zu analysieren folgten Untersuchungen der Proteinaktivität mittels Western Blot-Analysen.

Basierend auf der zentralen Rolle des PI3K/AKT/mTORC1-Wegs für das Zellwachstum von neuroendokrinen Zellen [57, 58] und der genannten (AMPK-abhängigen und -unabhängigen) Suppression von Tumoren durch Metformin [64, 65], untersuchten wir den Effekt von Metformin auf die mTORC1 nachgeschalteten Ziele in neuroendokrinen Tumorzellen und weiteren involvierten Akteure in vitro.

Dabei wurde der Phosphorylierungsgrad und damit der Aktivitätszustand der Proteine AMPK, S6K, 4-EPB1, ERK, AKT und GSK3 untersucht.

Bei AMPK handelt es sich um eine Serin-/Threonin-Kinase, welche durch LKB1 beziehungsweise einen erhöhten AMP/ATP-Quotienten aktiviert werden kann. Dadurch kommt es zur Phosphorylierung und damit zur Aktivierung von TSC-2, welches den mTOR-Signalweg hemmt. Aus diesem Grund kann man der AMPK einen hemmenden Einfluss auf die Zellproliferation zusprechen [76] (siehe Abbildung 2).

Pankreas BON1- und besonders Mitteldarm GOT1-NET-Zellen reagierten mit einer erhöhten AMPK-Phosphorylierung als Reaktion auf die Metforminbehandlung (Abbildung 8, S.- 39 - und Abbildung 9, S.- 40 -). Das weist darauf hin, dass die beobachteten antiproliferativen Effekte vermutlich teilweise durch einen AMPK-abhängigen Mechanismus vermittelt sind.

Im Gegensatz dazu reagierten bronchopulmonale NCI-H727-Zellen auf Metformin mit einer erniedrigten AMPK-Phosphorylierung (Abbildung 10, S.- 40 -), was auf eine Beteiligung eines AMPK-unabhängigen Signalwegs hindeutet.

S6K ist ebenfalls eine Serin-/Threonin-Kinase, die durch mTOR aktiviert wird. Die aktivierte S6K phosphoryliert daraufhin das S6-Ribosomale Protein, wodurch dieses verstärkt an der Proteinsynthese teilnehmen und dadurch das Zellwachstum fördern kann [77].

Das Protein 4EBP1 inhibiert die Genexpression und damit die Zellproliferation, indem es Transkriptionsfaktoren binden und somit blockieren kann [78]. Dies kann durch seine Phosphorylierung, zum Beispiel durch den mTOR-Signalweg unterbunden werden. (vgl. Abbildung 2, Seite - 19 -)

Die Behandlung mit Metformin in ansteigenden Dosierungen supprimierte die Phosphorylierung von 4EBP1, P70S6K und S6 in allen drei neuroendokrinen Zelllinien (Abbildung 11- Abbildung 16, S. - 41 - bis - 45 -). Dies deutet darauf hin, dass die durch Metformin verursachte Hemmung der Zellproliferation durch eine Inhibition des mTORC1-Signalwegs verursacht ist.

Die Hemmung der basalen und IGF-1 induzierten S6-Phosphorylierung in BON1- und NCIH727-Zellen durch Metformin war ähnlich der Hemmung der S6-Phosphorylierung durch den etablierten mTOR-Inhibitor Rapamycin, welcher als Positivkontrolle verwendet wurde (Abbildung 17, Seite - 47 -).

Bei ERK handelt es sich um eine Protein-Serine/Threonine Kinase. Diese ist ein Bestandteil des Ras-Raf-MEK-ERK-Signalwegs und übt über Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren aktivierenden Einfluss auf das Zellwachstum und Proliferation aus [76].

Die Komplexität des Metforminsignalwegs in NET unterschiedlichen Ursprungs ist weiterhin durch die beobachteten Unterschiede auf die ERK-Aktivität zu erkennen.

In Pankreas BON1- und bronchopulmonalen NCI-H727-Zellen induzierte Metformin eine ERK-Aktivierung (Abbildung 18 und Abbildung 19, S.- 48 - und - 49 -), während es in Mitteldarm GOT1-Zellen die ERK-Phosphorylierung supprimierte (Abbildung 20, S. - 49 -).

Der Ausfall der kompensatorischen ERK-Aktivierung in GOT1-Zellen kann ein Grund für die stärkere antiproliferative Wirkung von Metformin in diesen Zellen sein.

AKT, auch Proteinkinase B genannt, begünstigt ebenfalls durch Phosphorylierung das Zellwachstum und hemmt die Apoptose. Zusätzlich reguliert es die meisten durch Insulin vermittelten Stoffwechselwege. AKT wird durch Phosphorylierung an zwei Stellen aktiviert [76].

In NCI-H727-Zellen induzierten geringere Metformindosen eine AKT-Aktivierung, während höhere Dosierungen sie supprimierten (Abbildung 13, S. - 43 -).

Dagegen reagierten BON1- und GOT1-Zellen mit einer dosisabhängigen Erhöhung der AKT-Phosphorylierung zu allen gemessen Zeitpunkten (Abbildung 11 und Abbildung 15, S. - 41 - und - 45 -).

Dies spricht für eine zelltypabhängige kompensatorische AKT-Aktivierung als Reaktion auf die mTORC1-Hemmung durch Metformin, ähnlich den kompensatorischen Effekten des AKT-Signalwegs, welche bei einer Behandlung mit Everolimus zu sehen waren [79, 80].

Es kam in allen drei Zelllinien zu einer Phosphorylierung der GSK3 (Abbildung 18- Abbildung 20, S. - 48 - bis - 49 -). Die Phosphorylierung der Glykogen-Synthase-Kinase 3 (GSK3) führt zu deren Inaktivierung [76].

Zur genaueren Differenzierung der Effekte der Metformingabe auf den Zellzyklus der untersuchten Zellen wurden darauffolgend FACS-Analysen durchgeführt:

In Pankreas BON1- und bronchopulmonalen NCI-H727-NET, war die Metformin induzierte Zellproliferationshemmung nicht mit einer Apoptoseinduktion assoziiert, da Metformin den Prozentsatz der Zellen in der Sub-G0/1-Phase nicht erhöhte bzw. kein PARP cleavage induzierte. Stattdessen veränderte sich die Zellzyklusverteilung hin zu einer erhöhten G0/1-Phase und einem erniedrigtem S-Phase-Eintritt (Abbildung 21 und Abbildung 22, S. - 50 - und - 51 -).

Im Gegensatz dazu war der antiproliferative Effekt durch Metformin in Mitteldarm GOT1-Zellen zumindest teilweise mit einer Apoptoseinduktion assoziiert, was an einem erhöhten Prozentsatz an Zellen in der Sub-G0/1-Phase und gesteigertem PARP cleavage zu sehen war (Abbildung 23, S. - 51 -). Die Induktion der Apoptose in GOT1-Zellen ist möglicherweise mit der beobachteten Hemmung (statt einer kompensatorischen Aktivierung) des ERK-Signals assoziiert (ähnlich zu den Erkenntnissen in Phäochromozytomzelllinie; [81]) und erklärt so die potentere antiproliferative Wirkung von Metformin in dieser NET-Zelllinie. Zusätzlich könnte ein Grund für die stärkere antiproliferative Wirkung von Metformin auf GOT1-Zellen sein, dass das Wachstum dieser Zellen stärker vom Insulinsignal abhängig ist, da Insulin auch dem Vollmedium dieser Zelllinie zugegeben werden muss.

Resümierend kann man aus den Ergebnissen verschiedene Schlüsse ziehen. So ließen sich Unterschiede im Protein-Phosphorylierungszustand der untersuchten Zellreihen nach Metforminbehandlung erkennen. Die Komplexität des Metforminsignalwegs in NET unterschiedlichen Ursprungs ist durch die beobachteten Unterschiede auf die ERK-Aktivität zu erkennen. In Pankreas BON1- und bronchopulmonalen NCI-H727-Zellen induziert Metformin eine ERK-Aktivierung, während es in Mitteldarm GOT1-Zellen die ERK-Phosphorylierung supprimiert.

Wie bei den Ergebnissen zu sehen, ließen sich außerdem bei GOT1-Zellen nach einer Behandlung mit Metformin, die größten Effekte bezüglich Apoptose, Zellzahlverminderung und Minderung der Zellvialibilität verzeichnen.

ERK, eine Protein-Serin/Threonin-Kinase wird dabei als Bestandteil des Ras-Raf-MEK-ERK-Signalwegs ein potentiell-onkogener Einfluss auf das Zellwachstum nachgesagt [82]. Dies könnte einen Erklärungsansatz für die höhere Ansprechrate von GOT1-Zellen auf Metformin liefern, bei welchen die genannte Kinase ERK vermindert aktiv war.

Auch in vivo wären ähnliche differente Wirkungen wie bei den untersuchten Zellen denkbar, da NET eine sehr heterogene Gruppe von Tumoren bilden [1]. Da die kongruente Wirkung von Metformin auf ERK eine potentielle Ursache für einen verminderten Therapieerfolg darstellen könnte, ist ERK als mögliches Ziel für eine Kombinationstherapie in Erwägung zu ziehen. Dabei wäre durch Inhibition von ERK

eine Verstärkung der Wirksamkeit von Metformin, im Sinne eines pharmakodynamischen Synergismus, oder eine Verminderung der zu applizierenden Dosis möglich.

Die pharmakodynamische Interaktion von ERK-Hemmern wie zum Beispiel SCH772984 mit Metformin wäre ein interessantes Thema künftiger Studien.

Auch bei der Untersuchung von AKT wurden wie beschrieben unterschiedliche Phosphorylierungsgrade unter den untersuchten Zellreihen gefunden. So waren in GOT1- und BON1-Zellen eine erhöhte Phosphorylierung auszumachen (Abbildung 11 und Abbildung 15, S.- 41 - und - 45 -), während sich bei den NCI-H727-Zellen dosisabhängige Unterschiede aufzeigten (Abbildung 13, S. - 43 -). So führten niedrige Dosierungen zur Hyperphosphorylierung, während hohe Dosen von Metformin das Gegenteil bewirkten.

Hier ist es denkbar, dass die ERK- und AKT-Aktivierung eine kompensatorische Antwort auf die Behandlung mit Metformin und Inhibition des mTORC1-Signalwegs reflektiert. Die verminderte Phosphorylierung bei hohen Metforminkonzentrationen in NCI-H727-Zellen könnte für einen weiteren Signalweg sprechen, über welchen Metformin die AKT-Phosphorylierung hemmen kann.

Dies bedeutet, dass die Wirksamkeit simultaner Blockierung mehrerer Signalwege durch Kombinationsbehandlungen möglicherweise vom NET-Signalprofil abhängig ist. Dieses Phänomen scheint zelltypspezifisch zu sein, da die Behandlung von PANC-1 oder MiaPaCa-2 Pankreas Tumorzellen mit Metformin keine AKT- und/oder ERK-Aktivierung induzierte (im Gegensatz zu Rapamycin oder active-site mTOR-Hemmer) [83].

Es ist nicht klar, ob diese kompensatorischen Mechanismen, als Reaktion auf die mTOR-Hemmung, ein Zeichen für eine klinische Resistenz sind [80, 84] oder ein Zeichen für die Wirksamkeit der Behandlung [85]. Jedenfalls könnte eine simultane Hemmung des mTOR- und AKT- oder ERK-Signals den inhibitorischen Effekt auf die Zellproliferation in GEP-NET potenzieren [80]. Aus diesem Grund wären Kombinationsversuche von Metformin mit z.B. Everolimus von Interesse.

Die Kombination von klassischen chemotherapeutischen Mitteln und Metformin zur Behandlung von NET könnte ebenfalls von Vorteil sein, da Metformin in Studien die antiproliferative Wirkung von Cisplatin, Paclitaxel und Tamoxifen in Lungen-, Brust-

und Prostata-Krebszellen verbesserte und die orale Gabe von Metformin in Kombination mit Paclitaxel, Cisplatin oder Doxorubicin das Tumorwachstum in Mäusen im Vergleich zur jeweiligen Monotherapie deutlich reduzierte [29]. Dagegen könnte es auch die Wirkung von Chemotherapeutikern reduzieren [41], weshalb Studien notwendig sind, um die Wirksamkeit von Metformin bei Kombinationstherapien nachzuweisen.

Durch Kombinationstherapien im Allgemeinen könnte man möglicherweise zusätzlich die Dosierung der applizierten Medikamente reduzieren und somit die Toxizität und unerwünschte Arzneimittelwirkungen vermindern. Dabei sind im Speziellen Nebenwirkungen wie die Laktatazidose nach einer Metformingabe zu benennen [22].

Frühere Daten aus präklinischen Studien, welche Metformin eingesetzt haben, testeten relativ hohe Konzentrationen in vitro (1-40 mM (165-6600 mg/l); [86-89]) im Vergleich zu therapeutischen Plasmakonzentrationen im Menschen (2.8-15 µM (0.465-2.5 mg/l); [65]). Bei einer akuten Überdosierung von Menschen mit Metformin hatten Überlebende durchschnittlich eine Metforminkonzentration von 42 µg/ml und Verstorbene eine von 110 µg/ml [90]. Beide Metformin-Konzentrationen liegen damit in einem Bereich, der unter 1 mM liegt.

Andererseits sind in vitro möglicherweise höhere Metforminkonzentrationen notwendig, da die Tumorzellen in Kompletmedium kultiviert werden, welches extrem hohe Mengen an Wachstumsfaktoren und Glukose beinhaltet.

Auch der pharmakokinetische Einfluss der Medikamentenapplikation muss bei diesen Überlegungen berücksichtigt werden. Eine Akkumulation von Metformin in viel höheren Konzentration in Zellen des Gastrointestinaltrakts nach einer oralen oder i.v. Gabe ist denkbar [91].

Weitere präklinische in vivo Studien, mit einem größeren Spektrum an Metformindosierungen, sind notwendig, um die Effektivität von Metformin auf neuroendokrine Tumore zu testen mit Berücksichtigung dosisabhängiger Nebenwirkungen.

Zusätzlich sollte beachtet werden, dass Metformin aufgrund seiner physikalisch-chemischen Eigenschaften nicht durch passive Diffusion durch biologische

Membranen transportiert werden kann, sondern durch einen aktiven Transport über organische Kationentransporter (OCT's), welche daher einen determinierenden Faktor der therapeutischen Wirksamkeit darstellen. Die Tatsache, dass die Leber das am stärksten auf Metformin ansprechende Gewebe ist, ist durch die hohe Expression des Haupttransporters von Metformin, dem „solute carrier family 22 member 1“ (SLC22A1), auch als organischer Kationentransporter 1 (OCT1) bekannt, in der Leber bedingt. Es konnten zwei weitere OCT-Isoformen identifiziert werden. Die zelluläre Aufnahme von Metformin kann auch über den OCT2- (Gen SLC22A2) und OCT3-Transporter (Gen SLC22A3) vermittelt werden. OCT2 fehlt in der Leber, ist aber in den Nierentubuli stark exprimiert und vermittelt dort die Elimination von Metformin aus dem Kreislauf. So spielt OCT2 eine wichtige Rolle bei der Verfügbarkeit von Metformin, da die Sekretion von Metformin über die Nieren der Haupteliminationsweg von Metformin ist. Aus diesem Grund kann die unterschiedliche Expression von OCT1 und OCT2 sowie deren genetische Polymorphismen zu einer unterschiedlichen Reaktion auf eine Metformin-Behandlung in vivo beitragen [70].

Diese präklinische in vitro Studie demonstriert die Metformin bedingte Hemmung des Tumorwachstums und der Tumorsignalwege in neuroendokrinen Tumorzellen.

In Anbetracht der guten Verträglichkeit von Metformin und dem momentanen Mangel an effektiven, pharmakologischen, adjuvanten Therapien bei Patienten mit sporadischen (und/ oder MEN1-assoziierten) NET sind weitere Studien dringend notwendig.

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die antiproliferative Wirkung von Metformin auf neuroendokrine Tumorzellen in vitro getestet.

Der Hintergrund hierfür war, dass Metformin in vielen anderen Arbeiten auf diverse Tumorzellen eine hemmende Wirkung auf den mTOR-Signalweg, vor allem über die Aktivierung von AMPK, zeigte. Da Everolimus, ein mTOR-Hemmer, schon gute Ergebnisse beim Einsatz bei NET erzielt hat und Metformin möglicherweise ebenfalls in NET über diesen Signalweg agiert, wurden Zellviabilitäts-Assay's, Zellzahl-Zählversuche, FACS-Analysen und Western Blots durchgeführt.

Es konnte gezeigt werden, dass Metformin in allen drei Zellreihen (BON1, NCI-H727 und GOT1) dosisabhängig die Zellebensfähigkeit und Zellzahl senkt.

GOT1- und BON1-Zellen reagierten mit einer erhöhten AMPK-Phosphorylierung auf die Behandlung mit Metformin, während NCI-H727-Zellen eine verminderte Phosphorylierung nach der Behandlung aufwiesen. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass sowohl AMPK-abhängige (durch erhöhte Phosphorylierung) als auch AMPK-unabhängige (durch erniedrigte Phosphorylierung von AMPK) Einflüsse durch Metformin auf NET, abhängig von der Zellreihe, möglich sind. Die Suppression der Phosphorylierung von 4EBP1, P70S6K und S6 durch Metformin in allen drei Zellreihen, weist darauf hin, dass die Inhibition der Zellproliferation über den mTOR-Signalweg erfolgte. Die komplexe Wirkung von Metformin ist weiterhin daran zu erkennen, dass die ERK-Aktivität in den getesteten Zellreihen unterschiedlich ausfiel. So führte die Metforminbehandlung von GOT1-Zellen zu keiner ERK-Phosphorylierung und damit Aktivierung, im Gegensatz zu BON1- und NCI-H727-Zellen. Dieser Ausfall der kompensatorischen ERK-Aktivierung in GOT1-Zellen erklärt möglicherweise die stärkere Wirkung von Metformin auf diese Zellen. Zusätzlich führte die Gabe von Metformin zu einer zelltypabhängigen kompensatorischen Aktivierung von AKT. So kam es bei GOT1- und BON1-Zellen zu einer dosisabhängigen Erhöhung der AKT-Phosphorylierung und damit Aktivierung, während bei NCI-H727-Zellen der Phosphorylierungszustand abhängig

von der Metforminkonzentration variierte. Niedrige Dosierungen von Metformin führten in NCI-H727-Zellen zu einer AKT-Aktivierung und hohe Dosen supprimierten sie.

In den durchgeführten FACS-Analysen zeigte sich ebenfalls ein unterschiedliches Bild abhängig von der Zelllinie. Die Metforminbehandlung von GOT1-Zellen führte zumindest zum Teil zu einer Apoptose, was durch einen erhöhten Prozentsatz an Zellen in der Sub-G0/1-Phase gezeigt werden konnte. Zusätzlich erhöhte sich auch das PARP-cleavage, ebenfalls ein Marker für Apoptose. In BON1- und NCI-H727-Zellen induzierte Metformin keine Apoptose, jedoch eine erhöhte G0/1-Phase und einen erniedrigten S-Phase-Eintritt.

In Anbetracht der Ergebnisse sind weitere in vitro und später auch in vivo Studien zur Wirkung von Metformin als Mono- oder in Kombinationstherapie mit anderen PI3/ Akt/mTOR-Inhibitoren bzw. Ras/Raf/Mek/ERK-Inhibitoren von Interesse.

7. Literaturverzeichnis

1. Arnold, R., et al., *Neuroendokrine Tumoren*. Der Onkologe, 2004. **10**(6).
2. Bosman, F.T., et al., *WHO classification of tumours of the digestive system*. 4th ed. 2010, France: IARC Press.
3. Travis, W.D., *Advances in neuroendocrine lung tumors*. Annals of Oncology, 2010. **21**(suppl 7): p. vii65-vii71.
4. Arnold, R., B. Simon, and R. Göke, *Apudome: Neuroendokrine Tumoren des Gastrointestinaltrakts*, in *Die Onkologie*, W. Hiddemann and C.R. Bartram, Editors. 2010, Springer Berlin Heidelberg. p. 1459-1477.
5. Pape, U.F., et al., *Diagnostik und Therapie gastroenteropankreatischer neuroendokriner Tumore aus internistischer Sicht*. Der Onkologe, 2000. **6**(7): p. 624–633.
6. Kegel, T., H. Dralle, and H.J. Schmoll, *Neuroendokrine Tumoren (NET)*, in *Kompendium Internistische Onkologie*, H.-J. Schmoll, K. Höffken, and K. Possinger, Editors. 2006, Springer Berlin Heidelberg. p. 4101-4163.
7. Projektgruppe "Endokrine Tumoren" des Tumorzentrums München an den Medizinischen Fakultäten der LMU und der TU; *Manual Endokrine Tumoren, Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge*, ed. H.F. B. Göke, M. Reincke, C. Auernhammer. Vol. 3. 2013, München: W. Zuckschwerdt Verlag.
8. Blankenstein, O. and M. Pavel, *Neuroendokrine Tumoren*, in *PET/CT-Atlas*. 2011, Springer Berlin Heidelberg. p. 893-944.
9. Öberg, K., *Genetics and molecular pathology of neuroendocrine gastrointestinal and pancreatic tumors (gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors)*. Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity, 2009. **16**(1): p. 72-78 10.1097/MED.0b013e328320d845.
10. Grabowski, P., A. Sutter, and H. Scherübl, *Molekulare Regulation neuroendokriner Tumoren des Gastrointestinaltraktes*, in *Molekularmedizinische Grundlagen von para- und autokrinen Regulationsstörungen*, D. Ganten, K. Ruckpaul, and J. Köhrle, Editors. 2006, Springer Berlin Heidelberg. p. 291-308.

11. Anlauf, M., et al., *Neuroendokrine Neoplasien des gastroenteropankreatischen Systems*. Der Onkologe, 2011. **17**(7): p. 572-582.
12. Schott, M., et al., *Neuroendocrine neoplasms of the gastrointestinal tract*. Dtsch Arztebl Int, 2011. **108**(18): p. 305-12.
13. *ENETS Guidelines, TNM Grading, Standards of Care and Metastases: The 2012 ENETS Consensus Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Neuroendocrine Tumors*. [cited 2014 Feb.]; Available from: http://www.enets.org/guidelines_tnm_classifications.html.
14. Auernhammer, C.J., et al., *Medicinal therapy of metastasized neuroendocrine tumors of the gastroenteropancreatic system*. Der Internist, 2012: p. 167-176.
15. Rinke, A., et al., *Placebo-Controlled, Double-Blind, Prospective, Randomized Study on the Effect of Octreotide LAR in the Control of Tumor Growth in Patients With Metastatic Neuroendocrine Midgut Tumors: A Report From the PROMID Study Group*. Journal of Clinical Oncology, 2009. **27**(28): p. 4656-4663.
16. Andujar-Plata, P., X. Pi-Sunyer, and B. Laferrere, *Metformin effects revisited*. Diabetes Res Clin Pract, 2012. **95**(1): p. 1-9.
17. Malek, M., et al., *Risk of Cancer in Diabetes: The Effect of Metformin*. ISRN Endocrinol, 2013. **2013**: p. 9.
18. Dowling, R.J., P.J. Goodwin, and V. Stambolic, *Understanding the benefit of metformin use in cancer treatment*. BMC Med, 2011. **9**: p. 33.
19. Bailey, C.J. and C. Day, *Metformin: its botanical background*. Practical Diabetes International, 2004. **21**(3): p. 115-117.
20. Nathan, D.M., et al., *Medical Management of Hyperglycemia in Type 2 Diabetes: A Consensus Algorithm for the Initiation and Adjustment of Therapy: A consensus statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes*. Diabetes Care, 2009. **32**(1): p. 193-203.
21. Stumvoll, M., et al., *Metabolic Effects of Metformin in Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus*. New England Journal of Medicine, 1995. **333**(9): p. 550-554.

22. Graefe, K.H., W. Lutz, and H. Bönisch, *Duale Reihe Pharmakologie und Toxikologie*. Vol. 1. 2011, Stuttgart: Thieme. 1-857.
23. Evans, J.M.M., et al., *Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients*. BMJ, 2005. **330**(7503): p. 1304-1305.
24. Libby, G., et al., *New Users of Metformin Are at Low Risk of Incident Cancer: A cohort study among people with type 2 diabetes*. Diabetes Care, 2009. **32**(9): p. 1620-1625.
25. Landman, G.W.D., et al., *Metformin Associated With Lower Cancer Mortality in Type 2 Diabetes: ZODIAC-16*. Diabetes Care, 2010. **33**(2): p. 322-326.
26. Giovannucci, E., et al., *Diabetes and Cancer: A consensus report*. Diabetes Care, 2010. **33**(7): p. 1674-1685.
27. Friberg, E., et al., *Diabetes mellitus and risk of endometrial cancer: a meta-analysis*. Diabetologia, 2007. **50**(7): p. 1365-1374.
28. Ben, Q., et al., *Diabetes mellitus and risk of pancreatic cancer: A meta-analysis of cohort studies*. European Journal of Cancer. **47**(13): p. 1928-1937.
29. Bost, F., et al., *Metformin and cancer therapy*. Curr Opin Oncol, 2012. **24**(1): p. 103-8.
30. Lee, M.-S., et al., *Type 2 diabetes increases and metformin reduces total, colorectal, liver and pancreatic cancer incidences in Taiwanese: a representative population prospective cohort study of 800,000 individuals*. BMC Cancer, 2011. **11**(1): p. 20.
31. Jiralerspong, S., et al., *Metformin and Pathologic Complete Responses to Neoadjuvant Chemotherapy in Diabetic Patients With Breast Cancer*. Journal of Clinical Oncology, 2009. **27**(20): p. 3297-3302.
32. Xu, Y. and S. Lu, *Metformin Inhibits Esophagus Cancer Proliferation through Upregulation of USP7*. Cell Physiol Biochem, 2013. **32**(5): p. 1178-1186.
33. Zakikhani, M., et al., *Metformin is an AMP kinase-dependent growth inhibitor for breast cancer cells*. Cancer Research, 2006. **66**(21): p. 10269-10273.
34. Woodard, J. and L.C. Plataniias, *AMP-activated kinase (AMPK)-generated signals in malignant melanoma cell growth and survival*. Biochem Biophys Res Commun, 2010. **398**(1): p. 135-9.

35. Memmott, R.M., et al., *Metformin Prevents Tobacco Carcinogen–Induced Lung Tumorigenesis*. Cancer Prevention Research, 2010. **3**(9): p. 1066-1076.
36. Schneider, M.B., et al., *Prevention of pancreatic cancer induction in hamsters by metformin*. Gastroenterology, 2001. **120**(5): p. 1263-1270.
37. Hosono, K., et al., *Metformin Suppresses Colorectal Aberrant Crypt Foci in a Short-term Clinical Trial*. Cancer Prevention Research, 2010. **3**(9): p. 1077-1083.
38. Hadad, S., et al., *Evidence for biological effects of metformin in operable breast cancer: a pre-operative, window-of-opportunity, randomized trial*. Breast Cancer Research and Treatment, 2011. **128**(3): p. 783-794.
39. Shi, W.Y., et al., *Therapeutic metformin/AMPK activation blocked lymphoma cell growth via inhibition of mTOR pathway and induction of autophagy*. Cell Death Dis, 2012. **3**: p. e275.
40. Rocha, G.Z., et al., *Metformin amplifies chemotherapy-induced AMPK activation and antitumoral growth*. Clin Cancer Res, 2011. **17**(12): p. 3993-4005.
41. Janjetovic, K., et al., *Metformin reduces cisplatin-mediated apoptotic death of cancer cells through AMPK-independent activation of Akt*. Eur J Pharmacol, 2011. **651**(1-3): p. 41-50.
42. *ClinicalTrials.gov A service of the U.S. National Institutes of Health*. 27.06.2014]; Available from: <https://clinicaltrials.gov>.
43. Xu, C.-X., H.-H. Zhu, and Y.-M. Zhu, *Diabetes and cancer: Associations, mechanisms, and implications for medical practice*. World J Diabetes, 2014. **5**(3): p. 372-380.
44. Inoki, K., T. Zhu, and K.-L. Guan, *TSC2 Mediates Cellular Energy Response to Control Cell Growth and Survival*. Cell, 2003. **115**(5): p. 577-590.
45. Rattan, R., et al., *Metformin attenuates ovarian cancer cell growth in an AMP-kinase dispensable manner*. J Cell Mol Med, 2011. **15**(1): p. 166-78.
46. Hwang, Y.P. and H.G. Jeong, *Metformin blocks migration and invasion of tumour cells by inhibition of matrix metalloproteinase-9 activation through a calcium and protein kinase Calpha-dependent pathway: phorbol-12-myristate-13-acetate-induced/extracellular signal-regulated kinase/activator protein-1*. Br J Pharmacol, 2010. **160**(5): p. 1195-211.

47. Zhuang, Y. and W.K. Miskimins, *Cell cycle arrest in Metformin treated breast cancer cells involves activation of AMPK, downregulation of cyclin D1, and requires p27Kip1 or p21Cip1*. J Mol Signal, 2008. **3**: p. 18.
48. Inoki, K., et al., *TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling*. Nat Cell Biol, 2002. **4**(9): p. 648-657.
49. Markowska, A., et al., *Does Metformin affect ER, PR, IGF-1R, beta-catenin and PAX-2 expression in women with diabetes mellitus and endometrial cancer?* Diabetology & Metabolic Syndrome, 2013. **5**(1): p. 76.
50. Ben Sahra, I., et al., *Metformin, independent of AMPK, induces mTOR inhibition and cell-cycle arrest through REDD1*. Cancer Res, 2011. **71**(13): p. 4366-72.
51. Wolin, E.M., *PI3K/Akt/mTOR pathway inhibitors in the therapy of pancreatic neuroendocrine tumors*. Cancer Lett, 2013. **335**(1): p. 1-8.
52. Parekh, D., et al., *Characterization of a Human Pancreatic Carcinoid in Vitro: Morphology, Amine and Peptide Storage, and Secretion*. Pancreas, 1994. **9**(1): p. 83-90.
53. Cakir, M. and A. Grossman, *The molecular pathogenesis and management of bronchial carcinoids*. Expert Opinion on Therapeutic Targets, 2011. **15**(4): p. 457-491.
54. Kölby, L., et al., *A Transplantable Human Carcinoid as Model for Somatostatin Receptor-Mediated and Amine Transporter-Mediated Radionuclide Uptake*. The American journal of pathology, 2001. **158**(2): p. 745-755.
55. Nicoletti, I., et al., *A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry*. Journal of Immunological Methods, 1991. **139**(2): p. 271-279.
56. Auernhammer, C.J. and B. Goke, *Therapeutic strategies for advanced neuroendocrine carcinomas of jejunum/ileum and pancreatic origin*. Gut, 2011. **60**(7): p. 1009-1021.
57. Pavel, M., *Translation of Molecular Pathways into Clinical Trials of Neuroendocrine Tumors*. Neuroendocrinology, 2012. **97**(1): p. 99-112.
58. Weber, H.C., *Medical treatment of neuroendocrine tumours*. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes, 2013. **20**(1): p. 27-31.

59. Raymond, E., et al., *Sunitinib malate for the treatment of pancreatic neuroendocrine tumors*. N Engl J Med, 2011. **364**(6): p. 501-513.
60. Weber, H.C., *Medical treatment of neuroendocrine tumours*. Current Opinion in Endocrinology, Diabetes & Obesity, 2013. **20**(1): p. 27-31.
61. Thakker, R.V., et al., *Clinical practice guidelines for multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1)*. J Clin Endocrinol Metab, 2012. **97**(9): p. 2990-3011.
62. Tonelli, F., et al., *Pancreatic endocrine tumors in multiple endocrine neoplasia type 1 syndrome: review of literature*. Endocr Pract, 2011. **17 Suppl 3**: p. 33-40.
63. Larsson, O., et al., *Distinct perturbation of the translome by the antidiabetic drug metformin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(23): p. 8977-8982.
64. Emami Riedmaier, A., et al., *Metformin and cancer: from the old medicine cabinet to pharmacological pitfalls and prospects*. Trends Pharmacol Sci, 2012: p. 126-135.
65. Dowling, R.J., et al., *Metformin in cancer: translational challenges*. J Mol Endocrinol, 2012. **48**(3): p. 31-43.
66. Zitzmann, K., et al., *The novel mTOR inhibitor RAD001 (everolimus) induces antiproliferative effects in human pancreatic neuroendocrine tumor cells*. Neuroendocrinology, 2007. **85**(1): p. 54-60.
67. Yao, J.C., et al., *Everolimus for advanced pancreatic neuroendocrine tumors*. N Engl J Med, 2011. **364**(6): p. 514-523.
68. Pavel, M.E., et al., *Everolimus plus octreotide long-acting repeatable for the treatment of advanced neuroendocrine tumours associated with carcinoid syndrome (RADIANT-2): a randomised, placebo-controlled, phase 3 study*. Lancet, 2011. **378**(9808): p. 2005-2012.
69. Bost, F., et al., *Metformin and cancer therapy*. Current opinion in oncology, 2012. **24**(1): p. 103-108.
70. Salani, B., et al., *Metformin, cancer and glucose metabolism*. Endocrine-Related Cancer, 2014.
71. Ko, E.M., et al., *Metformin is associated with improved survival in endometrial cancer*. Gynecol Oncol, 2014. **132**(2): p. 438-442.

72. Li, D., et al., *Antidiabetic therapies affect risk of pancreatic cancer*. Gastroenterology, 2009. **137**(2): p. 482-488.
73. Niraula, S., et al., *Metformin in early breast cancer: a prospective window of opportunity neoadjuvant study*. Breast Cancer Res Treat, 2012. **135**(3): p. 821-830.
74. Dowling, R.J.O., et al., *Metformin in cancer: translational challenges*. Journal of Molecular Endocrinology, 2012. **48**(3): p. R31-R43.
75. Emami Riedmaier, A., et al., *Metformin and cancer: from the old medicine cabinet to pharmacological pitfalls and prospects*. Trends in Pharmacological Sciences, 2013. **34**(2): p. 126-135.
76. Rassow, J., K. Hauser, and R. Netzker, *Duale Reihe- Biochemie*. Vol. 3., vollst. überarb. u. erw. Aufl. 2012, Stuttgart: Thieme. 846.
77. Magnuson, B., B. Ekim, and D.C. Fingar, *Regulation and function of ribosomal protein S6 kinase (S6K) within mTOR signalling networks*. Biochemical Journal, 2012. **441**(1): p. 1-21.
78. Pause, A., et al., *Insulin-dependent stimulation of protein synthesis by phosphorylation of a regulator of 5'-cap function*. Nature, 1994. **371**(6500): p. 762-767.
79. Moreno, A., et al., *Antitumor activity of rapamycin and octreotide as single agents or in combination in neuroendocrine tumors*. Endocr Relat Cancer, 2008. **15**(1): p. 257-266.
80. Zitzmann, K., et al., *Compensatory activation of Akt in response to mTOR and Raf inhibitors - a rationale for dual-targeted therapy approaches in neuroendocrine tumor disease*. Cancer Lett, 2010. **295**(1): p. 100-109.
81. Nolting, S., et al., *Combined blockade of signalling pathways shows marked anti-tumour potential in pheochromocytoma cell lines*. J Mol Endocrinol, 2012. **49**(2): p. 79-96.
82. Roskoski Jr, R., *ERK1/2 MAP kinases: Structure, function, and regulation*. Pharmacological Research, 2012. **66**(2): p. 105-143.
83. Soares, H.P., et al., *Different Patterns of Akt and ERK Feedback Activation in Response to Rapamycin, Active-Site mTOR Inhibitors and Metformin in Pancreatic Cancer Cells*. PLoS One, 2013. **8**(2): p. e57289.

84. Svejda, B., et al., *Limitations in small intestinal neuroendocrine tumor therapy by mTor kinase inhibition reflect growth factor-mediated PI3K feedback loop activation via ERK1/2 and AKT*. Cancer, 2011. **117**(18): p. 4141-4154.
85. Meric-Bernstam, F., et al., *PIK3CA/PTEN mutations and Akt activation as markers of sensitivity to allosteric mTOR inhibitors*. Clin Cancer Res, 2012. **18**(6): p. 1777-1789.
86. Carvalho, C., et al., *Metformin promotes isolated rat liver mitochondria impairment*. Mol Cell Biochem, 2008. **308**(1-2): p. 75-83.
87. Capano, M. and M. Crompton, *Bax translocates to mitochondria of heart cells during simulated ischaemia: involvement of AMP-activated and p38 mitogen-activated protein kinases*. Biochem J, 2006. **395**(1): p. 57-64.
88. Gallo, A., et al., *Metformin prevents glucose-induced protein kinase C-beta2 activation in human umbilical vein endothelial cells through an antioxidant mechanism*. Diabetes, 2005. **54**(4): p. 1123-1131.
89. Kefas, B.A., et al., *Metformin-induced stimulation of AMP-activated protein kinase in beta-cells impairs their glucose responsiveness and can lead to apoptosis*. Biochem Pharmacol, 2004. **68**(3): p. 409-416.
90. Dell'Aglio, D.M., et al., *Acute metformin overdose: examining serum pH, lactate level, and metformin concentrations in survivors versus nonsurvivors: a systematic review of the literature*. Ann Emerg Med, 2009. **54**(6): p. 818-823.
91. Wilcock, C. and C.J. Bailey, *Accumulation of metformin by tissues of the normal and diabetic mouse*. Xenobiotica, 1994. **24**(1): p. 49-57.

8. Publikationen

8.1. Originalpublikationen

Vlotides G., Tanyeri A., Spampatti M., Zitzmann K., Chourdakis M., Spöttl G., Maurer J., Nölting S., Göke B., Auernhammer C. J.; „Anticancer effects of metformin on neuroendocrine tumor cells in vitro”. Hormones (Athens) 2014; DOI: 10.14310/horm.2002.1517

8.2. Kongressbeiträge

“10th Annual ENETS Conference” in Barcelona (03/13): In vitro anticancer effect of Metformin on neuroendocrine tumor cells (Vlotides G, Tanyeri A, Zitzmann K, Spampatti MP, Spöttl G, Maurer J, Göke B, Auernhammer CJ).

9. Danksagung

Mein Dank gilt:

PD Dr. med. Christoph Auernhammer, Leiter des Zentrums für Neuroendokrine Tumore München am Klinikum der Universität München -Campus Großhadern, für das Überlassen des Themas und die Betreuung meiner Arbeit.

Dr. rer. nat. Kathrin Zitzmann für die Einarbeitung und Hilfestellungen während des experimentellen Abschnittes.

Dr. med. George Vlotides für Unterstützung beim Verfassen einer wissenschaftlichen Arbeit.

Gerald Spöttl und Julian Maurer für die netten Stunden im Labor und ihre Hilfsbereitschaft und technische Unterstützung während meiner Versuche.

Weiterhin bedanke ich mich bei meinen Eltern und meinem Freund Markus für ihre Geduld und Unterstützung.